

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Biologie



Alžběta Krupičková

Život parazita uvnitř hostitelské buňky

Parasite's life within the host cell

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10. 5. 2014

.....

Poděkování

Děkuji svému školiteli Mgr. Pavlu Doležalovi, Ph.D. za poskytnuté rady a pomoc při vypracování bakalářské práce.

Abstrakt

Plasmodium falciparum patří k nejnebezpečnějším lidským intracelulárním jednobuněčným patogenům. Tato práce se věnuje invazi, přežívání a úniku z hostitelské buňky (erytrocytu). Ústředním tématem je přežívání parazita v hostitelské buňce uvnitř nově vytvořeného kompartmentu, parazitiformní vakuoly. Exportem několika stovek proteinů *Plasmodium falciparum* vytváří v hostitelské buňce a zejména na jejím povrchu řadu unikátních modifikací. Na závěr je uvedena kapitola o terapii a možném vývoji léčiv a kapitola o evoluci tohoto parazita

Klíčová slova: parazit, apikomplexa, hostitelská buňka, buněčné kompartmenty, efektorové molekuly, invaze, evoluce

Abstract

Plasmodium falciparum is one of the most dangerous human intracellular single-celled pathogen. This thesis describes the invasion, the survival and the egress of the pathogen from the host cell (erythrocyte). The main topic of the thesis is the parasite's life within the host cell in a newly created compartment, parasitophorous vacuole. By exporting hundreds of proteins *Plasmodium falciparum* establishes number of unique modifications inside as well as on the surface of the host cell. The thesis finishes with the chapter on the therapy and possible development of new drugs and the chapter on the parasite evolution.

Key words: parasite, apicomplexa, host cell, cellular compartments, effector molecules, invasion, evolution

Obsah

1	Úvod	1
2	Onemocnění	3
3	Životní cyklus.....	5
4	Stavba buňky	7
5	Invaze	9
5.1	Neorientované a orientované přichycení	9
5.2	Vlastní invaze	10
5.3	Mechanismus pohybu	10
6	Přežívání.....	13
6.1	Modifikace.....	13
6.1.1	Membrána parazitoformní vakuoly	13
6.1.2	Knobs	15
6.1.3	Změny v membráně a cytoskeletu membrány erytrocytu	16
6.1.4	Maurerovy štěrby	18
6.1.5	J body	19
6.1.6	Tubulovezikulární síť	19
6.2	Export proteinů	19
7	Únik z buňky	22
8	Terapie.....	23
9	Evoluce.....	24
10	Závěr.....	25
11	Seznam často používaných zkratk	26
12	Seznam použité literatury	27

1 Úvod

Intracelulární patogeni jsou organismy, které pronikají do hostitelských buněk (HB) a tráví zde většinu svého života. Do této skupiny patří jak viry a bakterie, tak i protista nebo dokonce mnohobuněčná eukaryota. Pod pojmem intracelulární parazit si však většina představí jednobuněčná eukaryota, tedy protista. V tab. 1 jsou vybráni nejdůležitější patogeni z této skupiny a jejich charakteristiky.

Parazit	Kde a v jaké buňce	Životní cyklus (ve které fázi využívá intracelulární život)	Onemocnění
<i>Plasmodium</i> spp.	parazitoformní vakuola: hepatocyt, erytrocyt, ...	DH ookinet (invaze) → sporozoiti MH sporozoit (invaze) → merozoiti merozoit (invaze) (→ gametocyty)	malárie
<i>Toxoplasma gondii</i>	parazitoformní vakuola: mnoho typů jaderných buněk	MH sporozoit (invaze) → tachyzoiti tachyzoit (invaze) → tkáňová cysta naplněná bradyzoity bradyzoit (invaze) → tachyzoiti	toxoplazmóza
<i>Leishmania</i> spp.	lysozom: makrofág	MH promastigot (invaze) → amastigot	leishmanióza
<i>Trypanosoma cruzi</i>	cytosol: mnoho typů buněk	MH trypomastigot (invaze) → amastigot → trypomastigot	Chagasova choroba
<i>Microsporidia</i> (<i>Encephalitozoon</i> , <i>Enterocytozoon</i>)	cytosol: epiteliální buňky	primární nebo sekundární spora s vymrštitelným vláknem (invaze) → mikrosporidie	

Tabulka 1: Nejvýznamnější jednobuněční eukaryotičtí intracelulární parazité a jejich charakteristiky. DH – definitivní hostitel; MH – meziphostitel.

Intracelulární paraziti volí strategii přežívání uvnitř buněk, protože je to pro ně bezpečné prostředí a můžou se tak vyhnout imunitnímu systému hostitele. Způsobů jak přežít v HB je několik. Parazit se může volně pohybovat v cytoplazmě (*Trypanosoma*

cruzi), přežívat v nově vytvořeném kompartmentu (*Plasmodium*) nebo modifikovat hostitelský kompartment (*Leishmania*).

Jedním z nejvýznamnějších intracelulárních jednobuněčných eukaryotních patogenů je plasmodium, zejména *Plasmodium falciparum*, které je původcem nejzávažnější formy malárie (nejvíce úmrtí). Plasmodium patří do skupiny apikomplexa stejně jako další významní původci lidských i zvířecích onemocnění (*Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Babesia*, ...). Jsou to většinou intracelulární parazité se složitými vývojovými cykly.

Cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o invazi a přežívání *Plasmodium falciparum* především v erytrocytech, kde tento patogen tráví většinu svého intracelulárního života v definitivním hostiteli. Tato práce jmenuje nejdůležitější modifikace a jejich důležité proteiny, které plasmodium v HB vytváří.

2 Onemocnění

Rod *Plasmodium* způsobuje malárii a zahrnuje několik druhů. Většina z nich parazituje na ptácích, ostatní mohou být patogenní pro hlodavce a jiné savce nebo pro plazy. Pro člověka jsou patogenní pouze 4 druhy (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum*), z nichž nejnebezpečnější je druh *P. falciparum* (viz tab. 2).

Druh parazita	Typ malárie	Inkubační doba	Intervaly horečky	Úmrtnost
<i>P. vivax</i>	malaria tertiana (třídenní)	8-16 dní	48 h	-
<i>P. ovale</i>	malaria tertiana (třídenní)	asi 15 dní	48 h	+/-
<i>P. malariae</i>	malaria quartana (čtyřdenní)	20-35 dní	72 h	+/-
<i>P. falciparum</i>	malaria tropica (tropická)	7-12 dní	nepravidelné	+

Tabulka 1: Druhy rodu *Plasmodium* patogenní pro člověka a hlavní znaky malárie jimi způsobené. Převzato z (Hausmann et al., 2003).

I když mortalita malárie klesla od roku 2000 o 45 %, stále jde o jednu z nejnebezpečnějších parazitárních nákaz. V ohrožení nákazy malárií je přibližně polovina světové populace. Největší počet případů a úmrtí se vyskytuje v subsaharské Africe. V roce 2012 malárie zapříčinila odhadem 627 000 úmrtí především dětí v Africe, případů malárie za stejný rok je odhadem 207 milionů (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>).

První symptomy (např.: bolest hlavy, horečka, bolest svalů, zvracení) jsou mírné a diagnostikovat tak onemocnění co nejdříve je velmi obtížné. Pokud není léčba zahájena včas, může se v případě *P. falciparum* vyvinout těžká malárie (viz tab. 3), která způsobuje nejvíce úmrtí.

Pro malárii jsou charakteristické horečnaté záchvaty, které následují po uvolnění generace merozoitů z erytrocytů, tento děj probíhá synchronně. Horečnaté záchvaty se střídají s dny, kdy se nemocný cítí dobře. Podle intervalů záchvatů se také jmenují jednotlivé typy malárií. Výjimkou je tropická malárie, během níž se objevují horečky časté a nepravidelné. Specifické parazitární glykofosfatidylinositoly (glycophosphatidylinositols = GPIs) uvolňované při prasknutí erytrocytu jsou hlavními toxiny parazita, tzv. PAMPs (Pathogen

Associated Molecular Patterns) rozpoznávané hostitelskými monocyty a makrofágy (Schofield and Hackett, 1993).

Syndromy	Klinické příznaky	Mechanismus onemocnění
Těžká anémie	Šok; poruchy vědomí; dýchací obtíže	Snížená produkce erytrocytů, zvýšená destrukce erytrocytů
Mozková malárie	Poruchy vědomí; křeče; dlouhotrvající neurologické problémy	Mikrovaskulární komplikace; prozánětlivé cytokiny; toxiny parazita
Metabolická acidóza	Dýchací obtíže; hypoxie; vysoká koncentrace laktátu v krvi; zrychlené dýchání; snížený venózní tlak	Nedostatečné prokrvování tkání; prozánětlivé cytokiny, produkty parazita; plicní komplikace
Ostatní	Nízká koncentrace glukózy v krvi, diseminovaná intravaskulární koagulace	Produkty a toxiny parazita; prozánětlivé cytokiny; cytoadherence

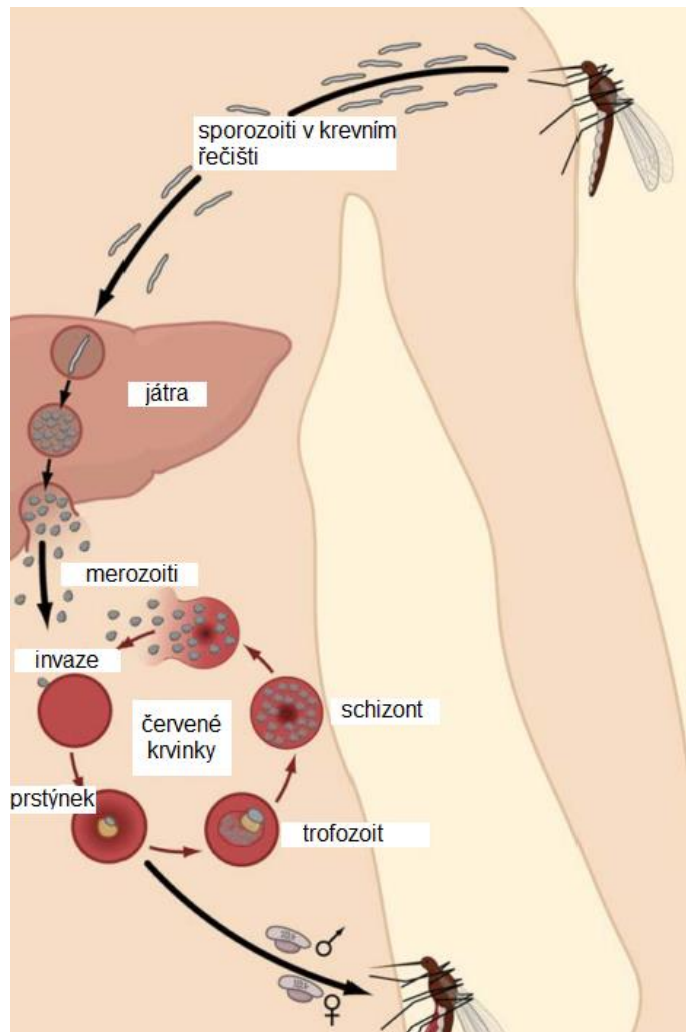
Tabulka 3: Klinické příznaky malárie a mechanismy onemocnění. Upraveno dle (Mackintosh et al., 2004).

3 Životní cyklus

Plasmodium je dvouhostitelský parazit. Definitivním hostitelem, ve kterém se pohlavně rozmnožuje, je bezobratlý přenašeč = vektor (komár *Anopheles*). Mezihostitelem je obratlovec (savec, pták, plaz), takže symptomy malárie jsou způsobeny nepohlavními stádii parazita.

Infikovaný komár injikuje sporozoity do obratlovčího hostitele, když na něm saje krev. Dlouzí, tenčí sporozoiti pronikají do jaterních sinusoid a přes Kupfferovy buňky do jaterních buněk (hepatocytů). Toto přesné směřování zajišťuje hlavní povrchový protein sporozoitů, CSP (circumsporozoite protein), který se specificky váže na heparan sulfát proteoglykany, HSPGs (heparan sulphate proteoglycans) jaterních buněk (Frevort et al., 1993). Sporozoit

prochází několika buňkami než invaduje finální hepatocyt, ve kterém vytvoří parazitofornní vakuolu (parasitophorous vacuole = PV) (Mota et al., 2001). Některé druhy (*P. vivax*, *P. ovale*) jsou schopny vytvářet v játrech dormantní stadia, tzv. hypnozoity, které mohou později způsobit relapsy onemocnění. V hepatocytech probíhá první exoerytrocytární merogonie (schizogonie), což je nepohlavní mnohonásobné dělení jádra a posléze rozpad na velké množství dceřiných buněk. Během krátké doby tak dochází k obrovskému množení buněk. Tisíce uvolněných merozoitů vstupují do erytrocytů. Jak je vidět na obr. 1 v erytrocytech podstupují merozoiti vývoj přes stadium prstýnku, dále stadium trofozoita a nakonec stadium schizonta, ve kterém probíhá druhá erytrocytární merogonie. Merozoiti uvolnění z rozpadlých erytrocytů opakují infekci a následně merogonii nebo se uvnitř erytrocytů mění na gametocyty. Pokud gametocyty nejsou nasáty komárem, brzy hynou.



Obrázek 1: Životní cyklus plasmodia v obratlovčím hostiteli. Upraveno dle (Cowman and Crabb, 2006).

Pokud jsou gametocyty s krví nasáty komárem, dozrávají ve střevě v samčí mikrogamety, které podstupují proces exflagelace, a samičí makrogamety. Mikrogamety a makrogamety spolu fúzí. Vzniká zygota, která se rychle prodlouží a stává se z ní pohyblivý ookinet. Ookinet proniká střevním epitelem a peritrofickou matrix a dostává se na hemocoelní stranu střeva komára. Tady se mění v tenkostěnnou oocystu čnicí do hemocoelu. V oocystě se vyvíjí mnoho sporozoitů, kteří po jejím prasknutí migrují hemolymfou do slinných žláz komára, kde čekají na příští sání (Cowman and Crabb, 2006).

4 Stavba buňky

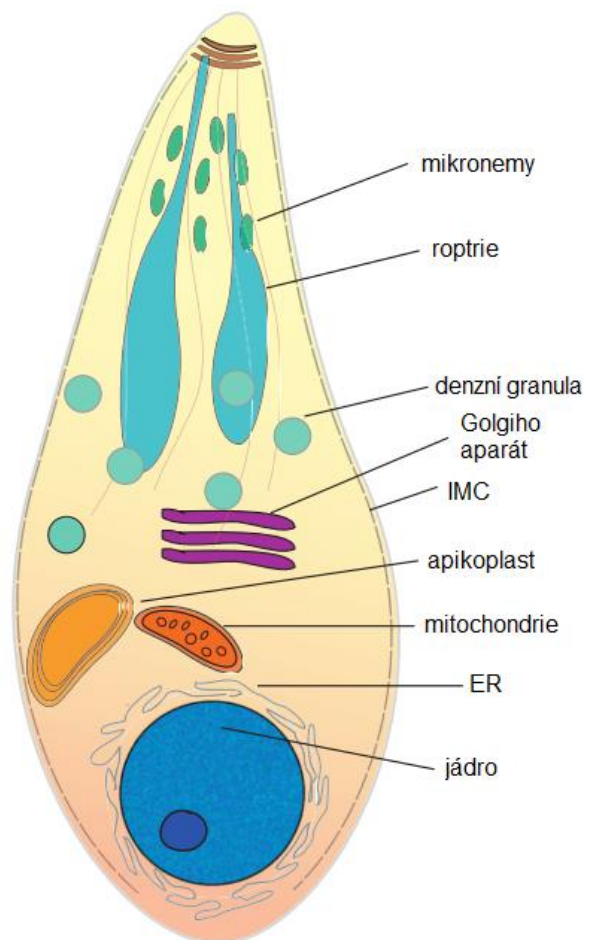
Buňka apikomplex obsahuje řadu unikátních organel, které zároveň představují důležité taxonomické znaky. Apikomplexa mají název po apikálním komplexu, který je umístěn na jednom pólu buňky a obsahuje několik invazních organel, mezi které patří mikronemy, roptrie a denzní granula (viz obr. 2).

Mikronemy jsou váčkovité sekretorické organely, které vylučují mikronemální proteiny (micronemal proteins = MICs), které jsou důležité pro správné rozpoznání HB a její invazi. Roptrie jsou sekretorické organely podlouhlého kyjovitého tvaru. Mají význam v invazi HB díky proteinům vylučovaných z užší „krční“ části (rhoptry neck proteins = RONS) (Richard et al., 2010). Proteiny vylučované z širší „cibulovité“ části (rhoptry bulb proteins = ROPs) mají funkci ve vývoji PV. Denzní granula se podílejí na modelování PV po invazi hostitelské buňky (Riglar et al., 2011). Je zajímavé, že přítomnost invazních organel závisí na stádiu vývoje parazita, např. ookinet postrádá roptrie, protože buňkou pouze prochází a nepotřebuje vytvářet PV (Vlachou et al., 2006).

Další sekretorické organely jsou nově objevené exonemy, mající úlohu při úniku parazita z HB (Yeoh et al., 2007).

V buňce parazita samozřejmě nechybí Golgiho aparát nebo jedna mitochondrie, která obsahuje jeden z nejmenších mitochondriálních genomů (Hikosaka et al., 2013).

Zajímavou organelu představuje apikoplast. Jedná se o sekundární plastid se čtyřmi membránami, který je kvůli některým syntetickým drahám pro apikomplexa nepostradatelný. Dnes se soudí, že tato endosymbiotická organela má původ v červené řase (Janouskovec et al., 2010).



Obrázek 2: Buňka apikomplex. IMC – vnitřní membránový komplex, ER – endoplazmatické retikulum. Upraveno dle (Klinger et al., 2013)

Další strukturou charakteristickou pro apikomplexa je vnitřní membránový komplex (inner membrane complex = IMC). Jde o kortikální alveoly, které charakterizují skupinu alveolata, do které apikomplexa patří. IMC tvoří zploštělé membránové měchýřky nacházející se těsně pod membránou, okraj buňky je tedy třímembránový.

5 Invaze

Plasmodium stejně jako ostatní apikomplexa používá k invazi buněk unikátní mechanismus rychlého pohybu závislého na substrátu, tzv. gliding (viz kap. 5.3). Gliding se nevyskytuje pouze u apikomplex, podobný mechanismus můžeme najít např. u penátních rozsivek (Poulsen et al., 1999).

Během invaze se vytváří tzv. pohyblivý spoj (moving junction = MJ), což je kroužkovitá struktura kolem parazita, která se pohybuje směrem dozadu. Parazit se tímto procesem dostává hlouběji do HB. Během tohoto děje se zároveň vytváří PV, oddělený kompartment, ve kterém parazit přežívá uvnitř HB. Bylo dokázáno, že při invazi jsou proteiny v cytoplazmatické membráně HB selektivně parazitem tříděny. Zatímco proteiny nacházející se v detergent-rezistentních raftech HB jsou internalizovány do membrány PV (parasitophorous vacuole membrane = PVM), ostatní proteiny jsou z PVM vylučovány. V PVM v erythrocytech se tak nachází např.: flotillin, aquaporin nebo skrambláza (Murphy et al., 2004).

MJ pravděpodobně slouží jako kotva k HB. Samotný parazitární aktino-myosinový motor pak slouží jako pohon invaze. Gonzalez a kol. (2009) navíc dokázali, že invaze apikomplex je závislá i na polymerizaci hostitelského aktinu. Invadující buňka zůstává obklopena hostitelským aktinem dokonce i krátce po vytvoření PV. To znamená, že invaze apikomplex není proces zcela nezávislý na HB, jak se původně myslelo.

5.1 Neorientované a orientované přichycení

Buňka parazita se nejprve přichytí na HB. Toto první přichycení je neorientované a relativně slabé. Následuje sekrece z mikronem, které jsou umístěny na apikálním konci buňky. Sekrece z mikronem a roptrií zajišťuje orientované přichycení.

Z mikronem je vylučován AMA1 (apical membrane antigen 1), který je před vlastní invazí přítomen na celém povrchu parazita. Mimo AMA1 jsou i další mikronemální proteiny, které jsou pro invazi velmi důležité. Ve stadiu sporozoita, jenž proniká do hepatocytů se jedná o TRAP (thrombospondin anonymous repeat protein) (Sultan et al., 1997). Homolog TRAP v merozoitech MTRAP (merozoite-specific TRAP homolog) je zase důležitý v invazi erythrocytů (Baum et al., 2006). Obě molekuly slouží jako adheziny vázající se k HB přes její receptory.

Poté se vylučují proteiny z krční části roptrií – RONs (Riglar et al., 2011). RONs se relokalizují do HB (Besteiro et al., 2009) a posléze interagují s AMA1 (Alexander et al., 2005), čímž je vytvořen základ MJ (viz obr. 3). Obě složky MJ (AMA1, RONs) jsou parazitárního původu a parazit si tak buduje struktury pro invazi zcela bez přispění HB, která je jím vlastně ztročena.

5.2 Vlastní invaze

MJ je tedy složen z proteinů vylučovanými mikronemami i roptriemi. Besteiro a kol. (2009) dokázali, že protein RON2 překlenuje membránu a interaguje s AMA1, zatímco ostatní (RON4, RON5) jsou umístěny v cytosolu HB. Nová studie (Tonkin et al., 2011) přinesla podrobnější informace o struktuře interakce AMA1- RON2. AMA1 má v sobě ukryt hydrofobní žlábek (kapsu), do kterého zapadá C-koncová smyčka RON2, která má tvar písmene U. Důležitými silami v této interakci jsou hydrofobní a elektrostatické síly. Interakce AMA1 s RONs byla nejdříve potvrzena u toxoplasmy a teprve poté i u plasmodia (Alexander et al., 2006; Richard et al., 2010; Srinivasan et al., 2011). To ukazuje na evoluční konzervovanost struktury a funkce MJ. Další potvrzení této struktury přinesli Collins a kol. (2009), kteří dokázali, že inhibiční protilátky proti AMA1, které se vážou do hydrofobního žlábků, zabraňují invazi. Blokováním AMA1 se znemožní vytvoření komplexu s RONs. Vyskytují se ovšem i názory, že AMA1 se přímo neúčastní MJ a pouze napomáhá invazi dosud neznámým způsobem (Bargieri et al., 2012).

Po vytvoření MJ se do nově vznikající PV začínají sekretovat ROPs (Riglar et al., 2011).

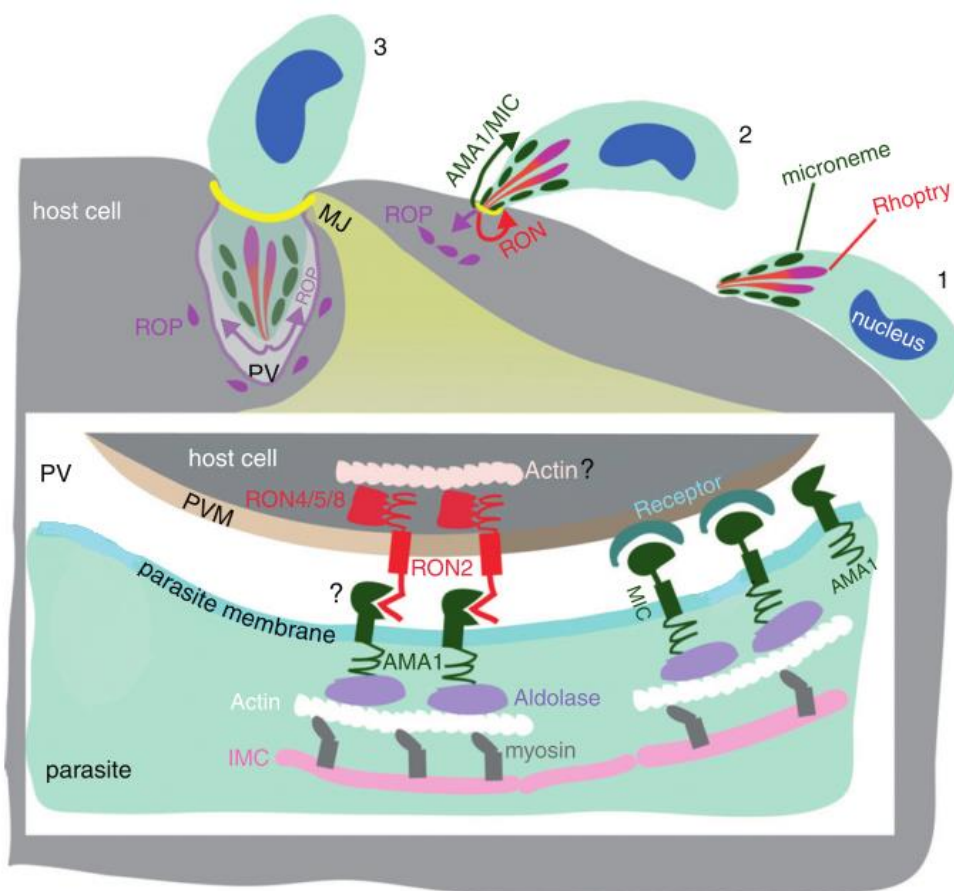
Během invaze parazit svléká své povrchové proteiny, aby mohl úspěšně vytvořit PV. Bylo zjištěno, že u merozoitů *Plasmodium* tuto funkci zajišťuje proteáza PfSUB2 (*Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 2). PfSUB2 je proteáza nacházející se v mikronemách a specificky štěpící AMA1 a povrchový protein merozoitů MSP1 (merozoit surface protein-1) (Harris et al., 2005).

5.3 Mechanismus pohybu

Již dlouho je známo, že podstatou glidingu je komplex aktinu a myosinu. Ale další části a přesnější funkce a popis jednotlivých molekul je stále upřesňován. Celý komplex molekul, který zajišťuje gliding, se nazývá glideosome.

Motorem celého komplexu je myosin A (MyoA) patřící do XIV. třídy myosinů. Jeho hlavice se pohybují po vytvářejícím se řetězci F-aktinu. Lehký řetězec myosinu (myosin light chain = MTIP) na jednom konci interaguje s koncovou doménou MyoA a na opačném konci je zasazen do IMC (Bergman, 2002). Stejně jako u toxoplasmu i u plasmodia se nacházejí dva pomocné proteiny – GAP45 a GAP50, které pomáhají zasazení myosinu do IMC (Baum et al., 2006).

Jak je ale tento komplex molekulárního motoru asociován s vlastními adheziny? Na to přinesli odpověď Jewett & Sibley (2003) když ukázali, že spojovací molekulou mezi aktinem a adheziny (TRAP) je aldoláza. Aldoláza je známá především jako glykolytický enzym štěpící fruktózu-1,6-bisfosfát na dvě triózy. Tato alternativní spojovací funkce je pro ni zcela unikátní. Aldoláza je na jednom konci připojena k aktinu a na druhém konci váže C-terminální doménu TRAP. V poslední době se ukázalo, že k aldoláze se váže i C-terminální konec AMA1 (Srinivasan et al., 2011).



Obrázek 3: Molekulární detaily pohyblivého spoje (MJ) formovaného během invaze hostitelské buňky (HB). (1) První přichycení je neorientované a umožňují ho rozmanité povrchové adheziny. (2) Mikronemální proteiny (MIC) vylučované z apikálního konce buňky zprostředkovávají orientovaný těsnější kontakt obou buněk. Vzápětí se vytváří MJ složený z AMA1 (apical membrane antigen 1) a

proteinů vylučovaných z krční části roptrií, RON (rhoptry neck proteins). (3) Po ustavení MJ se do nově vznikající parazitoformní vakuoly (PV) vylučují proteiny z cibulovité části roptrií, ROP (rhoptry bulb proteins). Membrána PV (PVM) je mohutně modifikována sekrecí z roptrií. Spodní obrázek ukazuje molekulární detaily MJ. MIC se váží na povrchové hostitelské receptory. AMA1 a RON2 jsou centrem vlastního MJ. AMA1 přes vazbu na aldolázu propojuje cytoskelet parazita (aktin, myosin, vnitřní membránový komplex (IMC)) s HB. Upraveno dle (Shen and Sibley, 2012).

Bylo dokázáno, že jednotlivé složky glideosomu (homolog TRAP-aldoláza-aktin-MyoA-MTIP-GAP45-GAP50) se nacházejí ve vybraných genomech apikomplex zahrnujících šest rodů (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Theileria*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Babesia*) (Baum et al., 2006), což ukazuje na evoluční konzervovanost glideosomu ve skupině apikomplexa.

6 Přežívání

Naprostou většinu životního cyklu stráví plasmodium v PV. Tento úplně oddělený kompartment zajišťuje lepší ochranu (únik před imunitním systémem), zároveň ale přináší problém s přísunem živin. Parazit musí zajistit dva druhy komunikace: mezi parazitem a HB i mezi parazitem a vnějším prostředím.

6.1 Modifikace

Bylo zjištěno, že parazit modifikuje HB (zde především erytrocyt). Vytváří zde několik nových struktur, které mu pomáhají k úspěšnému vývoji. K těmto strukturám patří: vytvoření PV a tím pádem i PVM, tubulovesikulární síť (tubulovesicular network = TVN), výrůstky (knobs) na membráně erytrocytu, Maurerovy štěrby (Maurer's clefts = MCs) a mnoho dalších změn.

6.1.1 Membrána parazitiformní vakuoly

Jak již bylo zmíněno, během invaze se zároveň kolem parazita vytváří parazitiformní vakuola (PV), ve které přežívá v intracelulárním období vývoje.

Membránu parazitiformní vakuoly (PVM) tvoří lipidy parazita i HB (Riglar et al., 2011). PVM je dále složena i z membránových proteinů HB (např.: flotilin, skrambláza), které jsou obsaženy v detergent-rezistentních raftech. Proteiny jsou však z raftů vybírány selektivně (např. chybí somatostatin) (Murphy et al., 2004). Asociace proteinů s detergent-rezistentními rafty je tedy nutná, ale nestačí k selektivnímu výběru do PVM.

V PVM se samozřejmě nacházejí i proteiny parazita, které se během vývoje mění. Některé proteiny jsou navíc důležité pro odlišná životní stádia: jaterní stadium, asexuální krevní stadium, gametocyt (Spielmann et al., 2012).

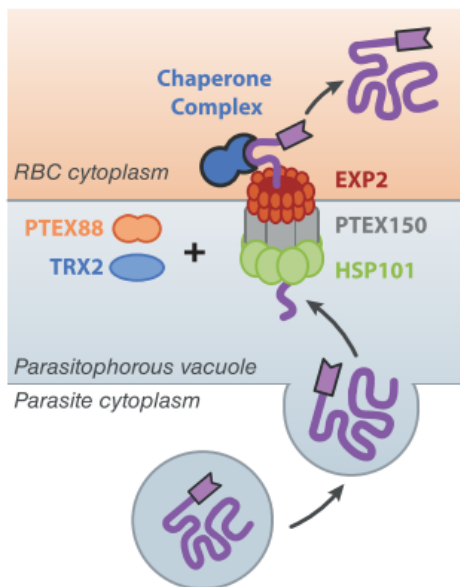
Protein, který se nachází v PVM ve všech stádiích je iontový kanál umožňující příjem živin z cytosolu erytrocytu. Tento pór je pro parazita velmi důležitý, protože příjem živin umožňuje rychlý růst v HB. Funguje jako vysokokapacitní molekulární síto s nízkou afinitou. Pórem mohou projít makromolekuly (aminokyseliny, monosacharidy) velké maximálně 1400 Da (Rosenberg and Desai, 1997).

Nejvíce prozkoumaný proteinový komplex v PVM s potvrzenou funkcí je translokon pro exportované proteiny PTEX (*Plasmodium falciparum* translocon of exported proteins) (de Koning-Ward et al., 2009). Jeho přítomnost v PVM byla předpokládána již před jeho

objevem. De Koning-Ward et al. použili dva přístupy pro určení proteinového komplexu: (i) proteomickou analýzu a (ii) ustavení pěti kritérií, které mají podklad v dřívějších experimentech: 1) proteiny se musí vyskytovat pouze v rodu *Plasmodium*, 2) hybnou silou je ATP, 3) proteiny komplexu musí mít dvojí lokalizace – apikální v merozoitech a v PVM prstýnkovitých stádií uvnitř erytrocytů a zároveň se musí vyskytovat v jaterních stádiích, 4) proteiny musí být nezbytné pro růst v krevních stádiích a 5) proteiny musí specificky vázat exportované proteiny.

Tyto jejich předpoklady splnil nejdříve komplex dvou proteinů HSP101 (heat shock protein 101) a PTEX150. HSP101 umí hydrolyzovat ATP a uvolněná energie zřejmě slouží k rozbalení exportovaných proteinů před vlastním transportem skrz PTEX. HSP101 patří do proteinové rodiny HSP100, která tvoří kruhové hexamerní komplexy, jež jsou často spojeny s translokony. Protein PTEX150 měl stejný transkripční profil jako HSP101, který zároveň ukázal, že exprese těchto proteinů je velice stabilní. Pomocí imunoprecipitace byly objeveny další podjednotky proteinového komplexu: EXP2 (exported protein 2), PTEX88, TRX2 (thioredoxin 2) (viz obr. 4). Celková hmotnost PTEX komplexu je větší než 1230 kDa (Bullen et al., 2012). EXP2 je pokládán za nejpravděpodobnějšího kandidáta tvořícího vlastní pór v PVM. Matthews et al. (2013) potvrdili, že všechny dosud zmíněné proteiny (HSP101, PTEX150, EXP2, PTEX88, TRX2) jsou právoplatnými členy PTEX. Zároveň ukázali, že TRX2 není nutný pro vytvoření PTEX. Linie hlodavčího druhu *P. berghei*, které postrádali TRX2, měli pomalejší růst a sníženou virulenci (Matthews et al., 2013).

Bullen et al. (2012) upřesnili apikální lokalizaci PTEX komplexu do denzních granulí. Části PTEX komplexu se vyskytují již v merozoitech před invazí erytrocytů, během invaze jsou uvolňovány z denzních granulí do nově vznikající PV. Navzdory stejné lokalizaci v denzních granulích se jednotlivé složky nepřepisují ve stejný čas. HSP101 a PTEX150 podléhají transkripci ve stádiu schizonta na rozdíl od EXP2, který je transkribován mnohem dříve. Proč není transkripce koregulována je nejasné.



Obrázek 4: Model pro translokon pro exportované proteiny PTEX (*Plasmodium falciparum* translocon of exported proteins). Exportované proteiny jsou sekretované z cytoplazmy parazita (parasite cytoplasm) do parazitoformní vakuoly (parasitophorous vacuole), poté jsou díky PTEX translokovány přes membránu parazitoformní vakuoly do cytoplazmy erytrocytu (RBC cytoplasm), kde jsou složeny díky komplexu chaperonů (chaperone complex). Upraveno dle (Elsworth et al., 2014).

6.1.2 Knobs

Knobs jsou modifikace, které zasahují do membránového cytoskeletu HB. Jedná se o kulovité elektronodenní výčnělky na cytoplazmatické membráně infikovaného erytrocytu. Zajišťují cytoadherenci, což je adheze k hostitelským epiteliálním buňkám. Infikované erytrocyty se vyčlení z hostitelského krevního oběhu a brání se tak fagocytickému zničení ve slezině (Raventos-Suarez et al., 1985), což způsobuje vážné komplikace. Existuje i alternativní hypotéza, kterou představil Saul (1999). Navrhuje myšlenku, že různorodé povrchové antigeny, které zajišťují cytoadherenci, mají primární roli ve vyvolání imunitní odpovědi (tj. rozpoznání parazita hostitelem). Nedochozí tak k překotné destrukci hostitele, parazit ustanovuje chronickou infekci a zajišťuje si tak větší úspěšnost přenosu do vektora. Další zvláštností je vznik rozet, které vznikají, když infikované erytrocyty přilnou k neinfikovaným a vytváří tak buněčné shluky. Podstata tohoto jevu je však doposud neznámá.

Hlavní složkou knobs je protein bohatý na histidin KAHRP (knob-associated histidin-rich protein), který je nutný pro vytvoření knobs (Crabb et al., 1997), konkrétně jsou vyžadovány C-terminální repetitivní oblasti (Rug et al., 2006). KAHRP spontánně tvoří shluky, které jsou ukotveny k membránovému cytoskeletu HB díky vazbě na aktin a spektrin (Oh et al., 2000). Bylo zjištěno, že KAHRP má velký podíl na zvýšené ztuhlosti membrány infikovaného erytrocytu (Glenister, 2002).

Další velmi důležitý člen knobs je PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1). Tento protein zajišťuje cytoadherenci (viz výše), tedy adhezi k receptorům hostitelských endoteliálních buněk, např.: CD36, thrombospondin a další (Baruch et al., 1996). Plasmodium obsahuje celou škálu různých forem PfEMP1, které jsou kódovány geny z rodiny *var* (Su et al., 1995). Regulace exprese jednotlivých *var* genů se projevuje jako antigenní variabilita. Antigenní variabilita je proces, při kterém parazit obměňuje své povrchové molekuly (antigeny). Imunitní systém hostitele sice produkuje specifické protilátky, ale po určité době parazit změní exprimovaný povrchový antigen, který vyžaduje produkci nových protilátek. Plasmodium tak ustanoví chronickou infekci.

Konzervovaná cytoplazmatická doména PfEMP1 se váže k KAHRP (Oh et al., 2000). PfEMP1 se dokáže transportovat na membránu erythrocytu i bez přítomnosti KAHRP, ale cytoadherence není tak úspěšná (Rug et al., 2006). Zároveň je PfEMP1 ukotveno k membránovému cytoskeletu HB přes vazbu k aktinu a spektrinu (Oh et al., 2000).

6.1.3 Změny v membráně a cytoskeletu membrány erythrocytu

Aby plasmodium mohlo přežít uvnitř HB, musí přijímat výživu a zbavovat se odpadních látek. Proto indukuje tvorbu tzv. propustných drah (new permeation pathways), a to expresí nových kanálů nebo pozměněním již existujících proteinů v membráně erythrocytu. Desai et al. (2000) byli první, kdo použili metodu terčíkového zámku (patch-clamp) na infikovaných a neinfikovaných erythrocytech. Zjistili, že infikované erythrocyty jsou až 150krát vodivější než neinfikované. Tím potvrdili existenci malého iontového kanálu selektivního na anionty (SCN^- , Cl^- , laktát). Existence kanálu propustného pro cukry, puriny, aminokyseliny a další látky nezbytné pro růst parazita byla předpovězena již dříve. Existují i další experimenty ukazující, že výše zmíněný kanál není jediný kanál, který plasmodium aktivuje (Huber et al., 2002). Liší se i názory na mechanismus aktivace: fosforylace či oxidativní stres (Staines et al., 2004).

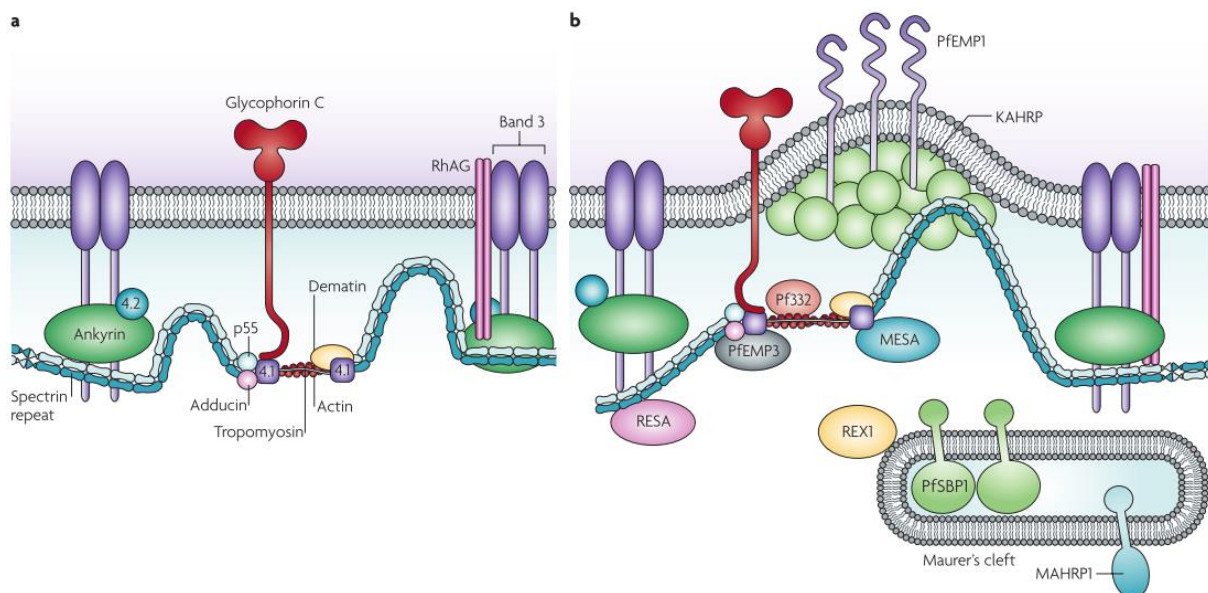
Infikované erythrocyty mají pozměněn i membránový cytoskelet vyskytující se těsně pod cytoplazmatickou membránou. Nalézají se zde i jiné parazitární proteiny než proteiny asociované s knobs (viz obr. 5). Níže je uveden výčet nejdůležitějších proteinů.

RESA (ring-infected erythrocyte surface antigen) je protein vyskytující se v denzních granulích (Culvenor et al., 1991). Po invazi do erythrocytu je transportován a váže se na spektrin, přesněji na repetici β -spektrinu, která je blízko dimer-dimer spektrinové interakce. RESA touto vazbou stabilizuje spektrinové tetramery a v důsledku zvyšuje rezistenci celé

membrány (Pei et al., 2007). To potvrzuje dřívější tvrzení, že RESA chrání infikované erythrocyty během horečnatých stavů. Pei et al. dále ukazují, že RESA a tím pádem i rovnováha mezi spektrinovými tetramery a dimery je důležitá pro invazi. Čím více RESA bylo v HB přítomno, tím menší byla úspěšnost invaze dalšími merozoity. Plasmodium se tak zřejmě brání proti vícenásobné invazi do stejné HB.

MESA (mature parasite-infected erythrocyte surface antigen) je protein vázající se na membránový cytoskeletární protein 4.1R. Oblast, na kterou se MESA váže, zahrnuje vazebná místa pro proteiny p55 a glykoforin C (Waller et al., 2003). Jmenované proteiny vytvářejí v neinfikovaných erythrocytech ternární komplex 4.1R-glykoforin C-p55. Experimentem bylo zjištěno, že MESA kompetuje s p55 o vazbu k 4.1R. MESA by tak *in vivo* mohl regulovat interakci 4.1R-p55 nebo dokonce interakce celého ternárního komplexu 4.1R-glykoforin C-p55 a tím upravovat stabilitu membránového cytoskeletu v infikovaných erythrocytech (Waller et al., 2003).

Parazit ovlivňuje membránový cytoskelet erythrocytu i jinými způsoby. Nedávno se ukázalo, že aktin-vázající protein dematin je po invazi rekrutován z membránového cytoskeletu a váže se na protein plasmodia (Lalle et al., 2011). To může zapříčinit dočasnou nestabilitu membrány, popř. uvolnit vazebné místo pro parazitární proteiny.



Obrázek 5: Membránový cytoskelet v neinfikovaném a infikovaném erythrocytu. (a) Neinfikovaný erythrocyt. Spektrinové heterodimery jsou pospojovány pohyblivými můstky a mohou tak přiměřeně reagovat na deformační tlak. Spektrinové dimery tvoří tetramery a jejich konce jsou napojeny na aktin, který je stabilizován proteinem 4.1R a dalšími proteiny. Spojení s membránou zajišťuje band 3-

*ankyrin-spektrin a 4.1R-p55-glykoforin C. (b) Infikovaný erytrocyt. Protein RESA (ring-infected erythrocyte surface antigen) váže spektrin. Protein KAHRP (knob-associated His-rich protein) tvoří ve zralých stádiích shluky a reaguje se spektrinem. Protein Pf332 a protein MESA (mature parasite-infected erythrocyte surface antigen) se vážou ke spojovacímu komplexu. Protein PfEMP3 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3) se váže ke spektrinu. Protein PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) zajišťující cytoadherenci se váže k KAHRP. Maurerovy štěrby (Maurer's clefts) jsou zapojeny do transportu PfEMP1. Jejich strukturu kontrolují: REX1 (ring exported protein 1) a MAHRP1 (membrane-associated His-rich protein 1), PfSBP1 (*Plasmodium falciparum* skeleton binding protein 1). Upraveno dle (Maier et al., 2009).*

6.1.4 Maurerovy štěrby

Maurerovy štěrby (Maurer's clefts = MCs) jsou váčkovité (cisternovité) struktury, které umožňují třídění a transport parazitárních proteinů do membrány erytrocytu. Mají tvar zploštělých váčků s různými výstupky a zřejmě vznikají pučením z PVM. Poté se však zcela oddělují a po dozrání nejsou ve spojení ani navzájem mezi sebou (Hanssen et al., 2008a). Cílová lokalizace MCs je pod membránou erytrocytu, kde jsou ukotveny spojkami (Hanssen et al., 2008a). Nezbytnou složkou těchto spojek je protein MAHRP2 (membrane-associated His-rich protein 2) (Pachlatko et al., 2010). Na propojení s membránou (knobs) se dále podílí parazitem upravený aktinový cytoskelet, který formuje MCs a možná usnadňuje transport samotných váčků (Cyrklaff et al., 2011). Zároveň bylo ukázáno, že proteiny exportované na povrch HB (např.: KAHRP, PfEMP1) před svým uvolněním přechodně interagují s MCs (Wickham et al., 2001).

MCs mají několik proteinů, které jsou pro ně specifické. Zde jsou jmenovány ty nejdůležitější.

Protein PfSBP1 (*Plasmodium falciparum* skeleton binding protein 1) se vyskytuje v membráně MCs a hraje zřejmě roli v lokalizaci MCs u cytoskeletu membrány (Blisnick et al., 2000).

MAHRP1 (membrane-associated His-rich protein 1) se také nachází v membráně MCs a je zodpovědný za transport PfEMP1 na membránu erytrocytů (Spycher et al., 2008).

Protein REX1 (ring exported protein 1) je lokalizován na vnější cytosolické straně membrány MCs (Hawthorne et al., 2004). REX1 je asociován s okraji MCs, jeho absence způsobila zaplněné cisterny MCs (Hanssen et al., 2008b).

6.1.5 J body

J body (J dots) jsou teprve nedávno objevené struktury v infikovaných erytrocytech. Byly pojmenovány po J doméně vyskytující se v kochaperonech Hsp40 (Heat shock proteins 40), které lokalizují do J bodů (Külzer et al., 2010). Jsou to malé transportní váčky, které obsahují chaperony a kochaperony. J body stejně jako MCs pomáhají při transportu exportovaných proteinů, na rozdíl od MCs nejsou nikde ukotveny a jsou mnohem menší (Külzer et al., 2010, 2012).

6.1.6 Tubulovezikulární síť

Tubulovezikulární síť (tubulovesicular network = TVN) je komplex výběžků z PVM, které zasahují hluboko do cytosolu erytrocytu. TVN zřejmě zajišťuje transport životně důležitých živin (adenosin, kyselina orotová, glutamát) k plasmodiu (Lauer, 1997).

6.2 Export proteinů

Export proteinů je pro plasmodium velmi důležitý, hlavně pro *P. falciparum*, které díky exportovaným proteinům modifikuje HB více než ostatní plasmodia. Soubor proteinů, které jsou sekretovány z parazita do HB se nazývá sekretom nebo exportom. Známé a důležité parazitární proteiny byly již popsány výše. Mechanismus exportu těchto proteinů je stále ještě málo prozkoumaný a zvláště v poslední době vyšlo najevo mnoho důležitých informací. Schéma exportu proteinů je naznačeno na obr. 6a.

Prvním společným znakem objeveným u exportovaných proteinů byl signál VTS (vacuolar transport signal) nebo také exportní element PEXEL (*Plasmodium* export element). Jde o pětičlenný motiv RxLxE/Q/D, který je konzervován v rodu *Plasmodium* a jehož mutace znemožňuje export. Bylo nalezeno asi 400 proteinů s PEXEL motivem, což představuje 8 % proteomu parazita (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004).

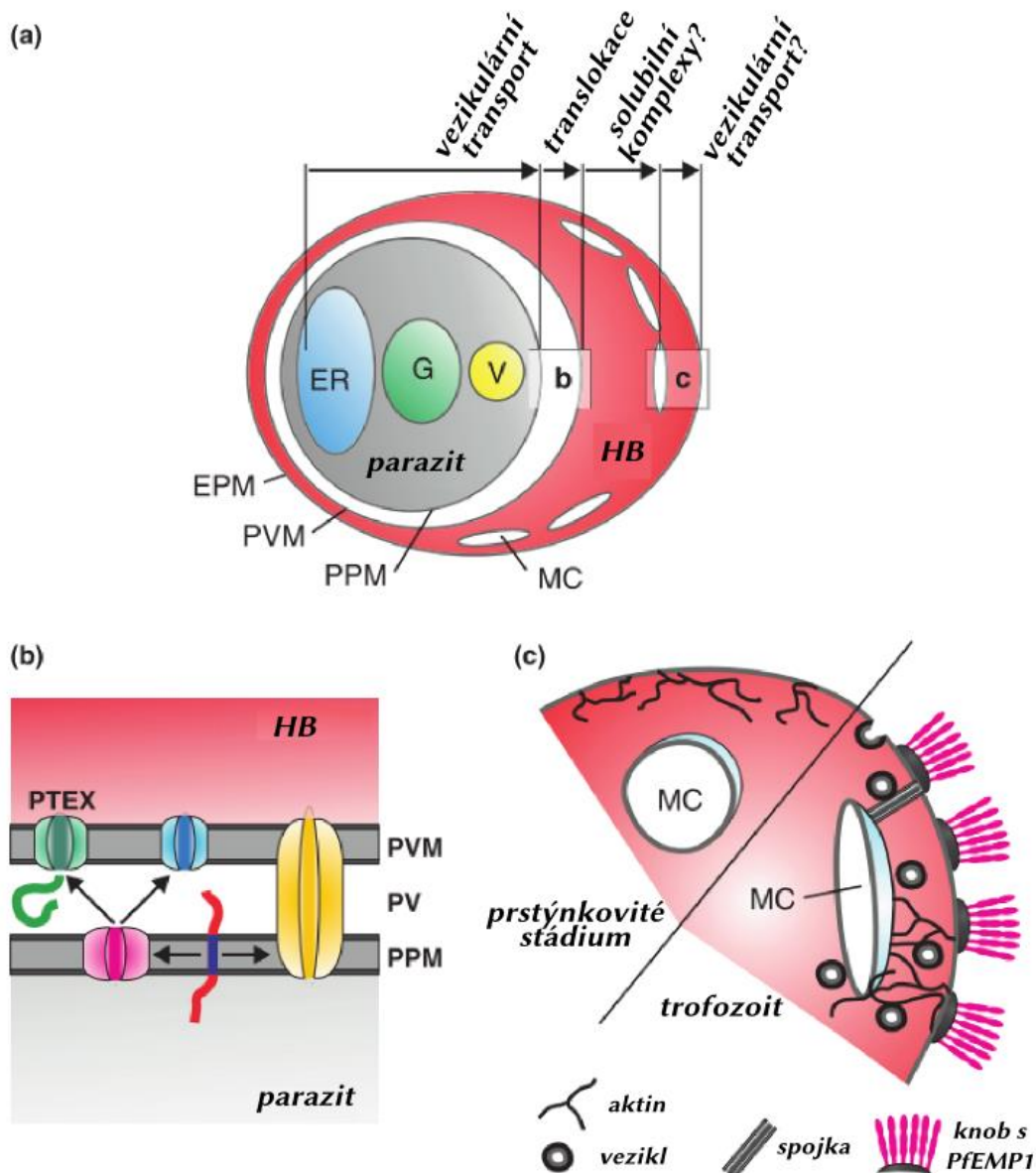
Exportované proteiny se nejprve dostanou do parazitárního endoplazmatického retikula (ER) pomocí signální sekvence. Proteiny s PEXEL motivem jsou v parazitárním ER připojeny PEXEL sekvencí k fosfatidylinositol-3-fosfátu (Bhattacharjee et al., 2012), který možná slouží k sortování proteinů. Následně jsou mezi 3. a 4. pozicí v PEXEL motivu štěpeny proteázou Plasmepsinem V (Boddey et al., 2010). N-konec proteinu je dále acetylován (Chang et al., 2008). Štěpení Plasmepsinem V je pro export nutné, samotný zralý N-konec (^{Ac}xE/Q/D) nestačí (Boddey et al., 2010).

Existuje jiná skupina proteinů nazývajících se PNEPs (PEXEL negative exported proteins), kterým PEXEL motiv chybí. Mají však vnitřní transmembránovou (TM) doménu, která je důležitá pro export (Grüning et al., 2012). Do PNEPs patří např.: PfSBP1, MAHRP1, MAHRP2, REX1; tedy proteiny, které asociují s MCs. Recentní experimenty ukázaly, že PNEPs jsou rozmanitější a četnější než se dosud myslelo a v sekretomu se jich může vyskytovat i několik desítek (Heiber et al., 2013).

Proteiny jsou z ER vezikulárním transportem dopraveny k periférii parazita. Solubilní proteiny jsou váčky sekretovány do PV a poté potřebují rozbalení pro přechod přes PVM. Transmembránové proteiny potřebují rozbalení už o krok dříve při přechodu přes parazitární plazmatickou membránu (parasite plasma membrane = PPM). Translokace by tak mohla být obecným mechanismem pro export proteinů z parazita do HB (Gehde et al., 2009; Grüning et al., 2012; Heiber et al., 2013) (viz obr. 6b). Jediným známým a popsáním komplexem, který se uplatňuje v translokaci, je PTEX (viz výše). Tento komplex je zasazen do PVM a translokuje pouze proteiny s PEXEL motivem. Přesný mechanismus transportu proteinů s PEXEL motivem přes PPM a i transport PNEPs přes obě membrány tak musí být ještě objasněn.

Nedávno objevené J body (viz výše) (Külzer et al., 2010) jsou zřejmě taktéž zapojeny do transportu parazitárních proteinů v cytosolu erytrocytu. Tyto mobilní váčky obsahují chaperony PfHsp70-x (*Plasmodium falciparum* heat shock protein 70) a kochaperony Hsp40 (Heat shock protein 40). Obě skupiny proteinů jsou kódovány parazitem a tvoří komplexy PfHsp70/40 (Külzer et al., 2010, 2012). Chaperony PfHsp70-x byly objeveny pouze u *P. falciparum* a blízkce příbuzného *P. reichenowi* (Külzer et al., 2012). Předpokládá se, že komplex chaperonů udržuje sekretované proteiny rozbalené příp. jim pomáhá ve složení. Tomu nasvědčuje i to, že PfEMP1 má stejné místo výskytu s komplexem Hsp70/40 (Külzer et al., 2012). Jak J body přispívají do exportu proteinů zůstává nejasné.

Další důležitou strukturou v transportu proteinů jsou Maurerovy štěrby (MCs). Dříve se myslelo, že slouží jako transportní váčky přes cytosol erytrocytu, protože MCs jsou v prstýnkovitém stádiu velmi mobilní (viz obr. 6c). Ukázalo se ale, že MCs se vytváří velmi brzo po invazi a jejich počet již zůstává konstantní (Grüning et al., 2011). MCs hrají roli v dopravě proteinů na povrch erytrocytu. Např. protein MAHRP1, který je umístěn v membráně MCs, je nezbytný pro transport PfEMP1 na povrch erytrocytu (Spycher et al., 2008).



Obrázek 6: Export proteinů do hostitelské buňky (HB). (a) Druhy transportů v konkrétních krocích membrána erythrocytu (erythrocyte plasma membrane = EPM), endoplazmatické retikulum (ER), Golgi (G), Maurerovy štěrby (Maurer's clefts = MC), sekreční váček (vesicle = V) (b) Možné uspořádání translokonů. Solubilní (zelený) a transmembránový (červený, modrá transmembránová část) protein. Solubilní protein prochází do HB přes PTEX. Transmembránový protein prochází do HB přes translokon spojující PPM i PVM nebo se dostává do PV a poté přechází přes PTEX nebo jiný pro PNEPs specifický translokon. (c) Vývoj MC. Odlišná stádia MC v prstýnkovitém stádiu a ve stádiu trofozoita. Stádium trofozoita je lépe přizpůsobeno k vezikulárnímu transportu virulentních faktorů na povrch HB. Upraveno dle (Marti and Spielmann, 2013).

7 Únik z buňky

K tomu, aby parazit přežil a úspěšně se množil, musí mj. umět správně a bezpečně uniknout z HB.

Jak již bylo zmíněno dříve, na úniku se podílejí speciální váčky exonemy, které obsahují proteázu PfSUB1 (subtilisin-like protease 1), která proteolyticky aktivuje protein SERA5 (serine-rich antigen 5). PfSUB1 patří do stejné superrodiny jako PfSUB2 mající úlohu při invazi. SERA5 je enzym důležitý pro únik parazita uplatňující se zřejmě při degradaci proteinů PVM, což vede k destabilizaci PVM (Yeoh et al., 2007). Arastu-Kapur et al. (2008) zjistili, že cysteinová proteáza DPAP3 (dipeptidyl peptidase 3) je nezbytná pro aktivaci PfSUB1 a je tak prvotním článkem spouštějícím tuto podstatnou proteázovou kaskádu.

P. falciparum (stejně jako *Toxoplasma gondii*) dokonce umí využívat hostitelskou proteázu calpain-1, která umí degradovat cytoskeletární proteiny (Chandramohanadas et al., 2009). Dalším nezbytným enzymem pro únik je vápníkově závislá protein kináza PfCDPK5 (calcium-dependent protein kinase) (Dvorin et al., 2010). Oba tyto enzymy jsou aktivovány vápníkem.

Před vlastním prasknutím se mění tvar erytrocytu z nepravidelného schizonta (dekompozice cytoskeletu) na kulatou strukturu (Glushakova et al., 2005). PV se zvětšuje kvůli vstupu vody z erytrocytu, zatímco celkově se erytrocyt zmenšuje. Zvýšením tlaku nejprve praskne PVM a hned poté vzniká v membráně erytrocytu pór (Glushakova et al., 2010). Při osmotické fázi úniku pórem uniknou pouze 1 – 2 merozoiti. Potom nastává elastická fáze, při které se konce póru zkroutí ven a membrána erytrocytu se odbaluje (viz obr. 7). Na konci tohoto procesu se změní křivka hostitelské membrány a merozoiti se tak rozptýlí (Abkarian et al., 2011).



Obrázek 7: Hlavní fáze úniku merozoitů z erytrocytu. **a)** Pór v membráně HB. **b)** Odbalování membrány HB. **c)** Konečné prohnutí membrány HB a rozptýlení merozoitů. Vytvořeno dle (Abkarian et al., 2011).

8 Terapie

P. falciparum během svého intracelulárního života využívá hemoglobin z erytrocytu, který degraduje a získává tak důležité aminokyseliny. Nevyužitá část hemoglobinu hem je však toxický a tak se v potravní vakuole parazita hromadí jeho netoxická krystalická forma hemozoin. Chlorochin je účinná látka, která ovlivňuje krystalizaci hemu, a patřila k nejlepším antimalarikům, než se vyvinula chlorochinová rezistence (Miller et al., 2013).

Dnes patří mezi nejúčinnější antimalarika artemisin a jeho deriváty. Tyto látky jsou aktivní krátkou dobu a jejich dávkování tak musí být velmi časté. Navíc se již objevuje rezistence, která byla prokázána v JV Asii v Kambodže (Dondorp et al., 2009). Proto je důležité hledat stále nová léčiva a tím pádem i možné cílové proteiny, které jsou důležité v konkrétních krocích životního cyklu parazita.

V invazi je možným cílovým proteinem AMA1. Cílovým místem pro možnou neutralizaci funkce AMA1 je hydrofobní kapsa proteinu, která zprostředkovává interakci s RON2 (viz výše). Malá molekula inhibující tuto interakci AMA1-RON2 by znemožnila úspěšnou invazi (Srinivasan et al., 2011).

Dalším cílovým proteinem by mohla být vápníkově závislá protein kináza PfCDPK5, která je nezbytná při úniku z erytrocytu. PfCDPK5 se vyvinula z rostlinné kinázy, což by mohlo znamenat lepší zacílení potenciálních inhibitorů, které by se nemuseli vázat na lidské kinázy (Chandramohanadas et al., 2009).

Těchto potenciálních cílových molekul je samozřejmě v životním cyklu parazita více, zde jsou uvedeny pouze dva příklady, které spadají do okruhu této práce. Zvláště lákavé léky jsou léky proti gametocytům, které by mohly přerušit šíření a stát se tak pomůckou v celkové eliminaci malárie (Miller et al., 2013).

9 Evoluce

Názory na evoluci *P. falciparum* prodělaly v posledních letech velký vývoj.

Escalante and Ayala (1994) vyvrátili původní myšlenku, že tento lidský patogen má původ v ptačím parazitovi a navrhli hypotézu, že lidský parazit *P. falciparum* se oddělil od blízkce příbuzného šimpanzího parazita *P. reichenowi* stejně jako jejich hostitelé před 4-7 miliony lety. *P. falciparum* a *P. reichenowi* patří do podrodu *Laverania*. Liu et al. (2011) potvrdili dřívější tvrzení, že v podrodu *Laverania* se nenalézají pouze *P. falciparum* a *P. reichenowi*, ale 6 oddělených druhů. Dále zjistili, že plasmodiální infekce jsou mezi lidoopi (*Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla*) velmi rozšířené a v jednotlivých lidoopích hostitelích se vyskytuje více druhů. Tato studie dále navrhla dosud nejvíce podporovanou hypotézu, že *P. falciparum* má původ v gorilím parazitovi.

Nedávná zjištění, že *P. falciparum* se může vyskytovat i v lidoopích hostitelích a naopak lidoopí plasmodia mohou být přenášena do lidských hostitelů jsou velmi znepokojivá. Lidoopi by tak mohli být zoonotickým rezervoárem těchto nebezpečných parazitů. Je tedy důležité sledovat plasmodia v lidských hostitelích, kteří přicházejí do kontaktu s lidoopi (Prugnolle et al., 2011).

10 Závěr

P. falciparum je nejzávažnějším lidským patogenem z rodu *Plasmodium*. Tento parazit patří do skupiny apikomplexa a způsobuje tropickou malárii.

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o intracelulárním životu *P. falciparum* v erytrocytu. To zahrnuje tři procesy: invaze, vlastní přežívání, únik. Největší pozornost byla dána přežívání parazita uvnitř buňky.

P. falciparum používá strategii ukrytí se v nově utvořeném kompartmentu parazitiformní vakuole. Je tak bezpečně ukryto, ale zároveň je pro něj obtížné získávat potřebné živiny a komunikovat. Proto parazit čteně modifikuje HB svými proteiny, které do HB exportuje. Umožňuje tak komunikaci s HB, ale i s vnějším prostředím. V práci jsou jmenovány nejdůležitější modifikace uvnitř i na povrchu HB a jejich podstatné proteiny. Dále je popsán mechanismus exportu parazitárních proteinů.

Je důležité i nadále studovat intracelulární přežívání parazita a mechanismy s ním spojené, protože mnoho mechanismů a zodpovědných proteinů je ještě neznámých. Přesto tato oblast výzkumu přinesla v posledních letech mnoho nových poznatků, které mohou být uplatněny v hledání nových léčiv, jak je uvedeno v kapitole Terapie.

11 Seznam často používaných zkratek

AMA1	„apical membrane antigen 1“
ER	endoplazmatické retikulum
EXP2	„exported protein 2“
HB	hostitelská buňka
HSP	„heat shock protein“
IMC	vnitřní membránový komplex („inner membrane complex“)
KAHRP	„knob-associated histidin-rich protein“
MAHRP1(2)	„membrane-associated His-rich protein 1 (2)“
MCs	Maurerovy štěrbinny („Maurer’s clefts“)
MESA	„mature parasite-infected erythrocyte surface antigen“
MJ	pohyblivý spoj („moving junction“)
PEXEL	„ <i>Plasmodium</i> export element“
PfCDPK5	„calcium-dependent protein kinase“
PfEMP1	„ <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1“
PfSBP1	„ <i>Plasmodium falciparum</i> skeleton binding protein 1“
PfSUB1(2)	„ <i>Plasmodium falciparum</i> subtilisin-like protease 1 (2)“
PNEPs	„PEXEL negative exported proteins“
PPM	plazmatická membrána parazita („parasite plasma membrane“)
PTEX	„ <i>Plasmodium falciparum</i> translocon of exported proteins“
PV	parazitoformní vakuola
PVM	membrána parazitoformní vakuoly
RESA	„ring-infected erythrocyte surface antigen“
REX1	„ring exported protein 1“
RONs	proteiny vylučované z užší části roptrií („rhoptry neck proteins“)
ROPs	proteiny vylučované z širší části roptrií („rhoptry bulb proteins“)
SERA5	„serine-rich antigen 5“
TRAP	„thrombospondin anonymous repeat protein“
TRX2	„thioredoxin 2“
TVN	tubulovezikulární síť

12 Seznam použité literatury

- Abkarian, M., Massiera, G., Berry, L., Roques, M., and Braun-Breton, C. (2011). A novel mechanism for egress of malarial parasites from red blood cells. *Blood* 117, 4118–4124.
- Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P., and Boothroyd, J.C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* 1, e17.
- Alexander, D.L., Arastu-Kapur, S., Dubremetz, J.-F., and Boothroyd, J.C. (2006). *Plasmodium falciparum* AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell* 5, 1169–1173.
- Arastu-Kapur, S., Ponder, E.L., Fonović, U.P., Yeoh, S., Yuan, F., Fonović, M., Grainger, M., Phillips, C.I., Powers, J.C., and Bogyo, M. (2008). Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Chem. Biol.* 4, 203–213.
- Bargieri, D., Lagal, V., Tardieux, I., and Ménard, R. (2012). Host cell invasion by apicomplexans: what do we know? *Trends Parasitol.* 28, 131–135.
- Baruch, D.I., Gormely, J. a, Ma, C., Howard, R.J., and Pasloske, B.L. (1996). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3497–3502.
- Baum, J., Richard, D., Healer, J., Rug, M., Krnajski, Z., Gilberger, T.-W., Green, J.L., Holder, A. a, and Cowman, A.F. (2006). A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J. Biol. Chem.* 281, 5197–5208.
- Bergman, L.W. (2002). Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. *J. Cell Sci.* 116, 39–49.
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J.-F., and Lebrun, M. (2009). Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. *PLoS Pathog.* 5, e1000309.
- Bhattacharjee, S., Stahelin, R. V, Speicher, K.D., Speicher, D.W., and Haldar, K. (2012). Endoplasmic reticulum PI(3)P lipid binding targets malaria proteins to the host cell. *Cell* 148, 201–212.
- Blisnick, T., Eugenia, M., Betoulle, M., Barale, J., Uzureau, P., Berry, L., Desroses, S., Fujioka, H., Mattei, D., and Braun, C. (2000). Pfsbp1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *III*, 107–121.
- Boddey, J.A., Hodder, A.N., Günther, S., Gilson, P.R., Kapp, E.A., Pearce, J.A., Koningward, T.F. De, Richard, J., Crabb, B.S., and Cowman, A.F. (2010). An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. *463*, 627–631.

- Bullen, H.E., Charnaud, S.C., Kalanon, M., Riglar, D.T., Dekiwadia, C., Kangwanrangsang, N., Torii, M., Tsuboi, T., Baum, J., Ralph, S. a, et al. (2012). Biosynthesis, localization, and macromolecular arrangement of the *Plasmodium falciparum* translocon of exported proteins (PTEX). *J. Biol. Chem.* *287*, 7871–7884.
- Collins, C.R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., and Blackman, M.J. (2009). An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. *PLoS Pathog.* *5*, e1000273.
- Cowman, A.F., and Crabb, B.S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* *124*, 755–766.
- Crabb, B.S., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Waller, R.F., Caruana, S.R., Davern, K.M., Wickham, M.E., Brown, G. V, Coppel, R.L., and Cowman, A.F. (1997). Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* *89*, 287–296.
- Culvenor, J.G., Day, K.P., and Anders, R.F. (1991). *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infect. Immun.* *59*, 1183–1187.
- Cyrklaff, M., Sanchez, C.P., Kilian, N., Bisseye, C., Simporé, J., Frischknecht, F., and Lanzer, M. (2011). Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Science* *334*, 1283–1286.
- Desai, S. a, Bezrukov, S.M., and Zimmerberg, J. (2000). A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature* *406*, 1001–1005.
- Dondorp, A.M., Nosten, F., Poravuth, Y., Das, D., Phyo, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Arie, F., Hanpithakpong, W., Ph, D., et al. (2009). Artemisinin Resistance in. 455–467.
- Dvorin, J.D., Martyn, D.C., Patel, S.D., Grimley, J.S., Collins, C.R., Hopp, C.S., Bright, a T., Westenberger, S., Winzeler, E., Blackman, M.J., et al. (2010). A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science* *328*, 910–912.
- Elsworth, B., Crabb, B.S., and Gilson, P.R. (2014). Protein export in malaria parasites: an update. *Cell. Microbiol.* *16*, 355–363.
- Escalante, a a, and Ayala, F.J. (1994). Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 11373–11377.
- Frevert, U., Sinnis, P., Cerami, C., Shreffler, W., Takacs, B., and Nussenzweig, V. (1993). Malaria Circumsporozoite Protein Binds to Heparan Sulfate Proteoglycans Associated with the Surface Membrane of Hepatocytes. *177*.
- Gehde, N., Hinrichs, C., Montilla, I., Charpian, S., Lingelbach, K., and Przyborski, J.M. (2009). Protein unfolding is an essential requirement for transport across the parasitophorous vacuolar membrane of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* *71*, 613–628.
- Glenister, F.K. (2002). Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood* *99*, 1060–1063.

- Glushakova, S., Yin, D., Li, T., and Zimmerberg, J. (2005). Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Curr. Biol.* *15*, 1645–1650.
- Glushakova, S., Humphrey, G., Leikina, E., Balaban, A., Miller, J., and Zimmerberg, J. (2010). New stages in the program of malaria parasite egress imaged in normal and sickle erythrocytes. *Curr. Biol.* *20*, 1117–1121.
- Gonzalez, V., Combe, A., David, V., Malmquist, N. a, Delorme, V., Leroy, C., Blazquez, S., Ménard, R., and Tardieux, I. (2009). Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell. *Cell Host Microbe* *5*, 259–272.
- Grüning, C., Heiber, A., Kruse, F., Ungefehr, J., Gilberger, T.-W., and Spielmann, T. (2011). Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions. *Nat. Commun.* *2*, 165.
- Grüning, C., Heiber, A., Kruse, F., Flemming, S., Franci, G., Colombo, S.F., Fasana, E., Schoeler, H., Borgese, N., Stunnenberg, H.G., et al. (2012). Uncovering common principles in protein export of malaria parasites. *Cell Host Microbe* *12*, 717–729.
- Hanssen, E., Sougrat, R., Frankland, S., Deed, S., Klonis, N., Lippincott-Schwartz, J., and Tilley, L. (2008a). Electron tomography of the Maurer’s cleft organelles of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes reveals novel structural features. *Mol. Microbiol.* *67*, 703–718.
- Hanssen, E., Hawthorne, P., Dixon, M.W. a, Trenholme, K.R., McMillan, P.J., Spielmann, T., Gardiner, D.L., and Tilley, L. (2008b). Targeted mutagenesis of the ring-exported protein-1 of *Plasmodium falciparum* disrupts the architecture of Maurer’s cleft organelles. *Mol. Microbiol.* *69*, 938–953.
- Harris, P.K., Yeoh, S., Dluzewski, A.R., O’Donnell, R. a, Withers-Martinez, C., Hackett, F., Bannister, L.H., Mitchell, G.H., and Blackman, M.J. (2005). Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathog.* *1*, 241–251.
- Hausmann, K., Hülsmann, N., and et al. (2003). *Protozoologie* (Academia).
- Hawthorne, P.L., Trenholme, K.R., Skinner-Adams, T.S., Spielmann, T., Fischer, K., Dixon, M.W. a, Ortega, M.R., Anderson, K.L., Kemp, D.J., and Gardiner, D.L. (2004). A novel *Plasmodium falciparum* ring stage protein, REX, is located in Maurer’s clefts. *Mol. Biochem. Parasitol.* *136*, 181–189.
- Heiber, A., Kruse, F., Pick, C., Grüning, C., Flemming, S., Oberli, A., Schoeler, H., Retzlaff, S., Mesén-Ramírez, P., Hiss, J. a, et al. (2013). Identification of new PNEPs indicates a substantial non-PEXEL exportome and underpins common features in *Plasmodium falciparum* protein export. *PLoS Pathog.* *9*, e1003546.
- Hikosaka, K., Kita, K., and Tanabe, K. (2013). Diversity of mitochondrial genome structure in the phylum Apicomplexa. *Mol. Biochem. Parasitol.* *188*, 26–33.
- Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estraño, C., and Haldar, K. (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* *306*, 1934–1937.

- Huber, S.M., Uhlemann, A.-C., Gamper, N.L., Duranton, C., Kremsner, P.G., and Lang, F. (2002). Plasmodium falciparum activates endogenous Cl⁻ channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J.* *21*, 22–30.
- Chandramohanadas, R., Davis, P.H., Beiting, D.P., Harbut, M.B., Darling, C., Velmourougane, G., Lee, M.Y., Greer, P. a, Roos, D.S., and Greenbaum, D.C. (2009). Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells. *Science* *324*, 794–797.
- Chang, H.H., Falick, A.M., Carlton, P.M., Sedat, J.W., DeRisi, J.L., and Marletta, M. a (2008). N-terminal processing of proteins exported by malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* *160*, 107–115.
- Janouskovec, J., Horák, A., Oborník, M., Lukes, J., and Keeling, P.J. (2010). A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 10949–10954.
- Jewett, T.J., and Sibley, L.D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol. Cell* *11*, 885–894.
- Klinger, C.M., Nisbet, R.E., Ouologuem, D.T., Roos, D.S., and Dacks, J.B. (2013). Cryptic organelle homology in apicomplexan parasites: insights from evolutionary cell biology. *Curr. Opin. Microbiol.* *16*, 424–431.
- De Koning-Ward, T.F., Gilson, P.R., Boddey, J. a, Rug, M., Smith, B.J., Papenfuss, A.T., Sanders, P.R., Lundie, R.J., Maier, A.G., Cowman, A.F., et al. (2009). A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature* *459*, 945–949.
- Külzer, S., Rug, M., Brinkmann, K., Cannon, P., Cowman, A., Lingelbach, K., Blatch, G.L., Maier, A.G., and Przyborski, J.M. (2010). Parasite-encoded Hsp40 proteins define novel mobile structures in the cytosol of the *P. falciparum*-infected erythrocyte. *Cell. Microbiol.* *12*, 1398–1420.
- Külzer, S., Charnaud, S., Dagan, T., Riedel, J., Mandal, P., Pesce, E.R., Blatch, G.L., Crabb, B.S., Gilson, P.R., and Przyborski, J.M. (2012). Plasmodium falciparum-encoded exported hsp70/hsp40 chaperone/co-chaperone complexes within the host erythrocyte. *Cell. Microbiol.* *14*, 1784–1795.
- Lalle, M., Currà, C., Ciccarone, F., Pace, T., Cecchetti, S., Fantozzi, L., Ay, B., Breton, C.B., and Ponzi, M. (2011). Dematin, a component of the erythrocyte membrane skeleton, is internalized by the malaria parasite and associates with Plasmodium 14-3-3. *J. Biol. Chem.* *286*, 1227–1236.
- Lauer, S. a. (1997). A Membrane Network for Nutrient Import in Red Cells Infected with the Malaria Parasite. *Science* (80-). *276*, 1122–1125.
- Liu, W., Li, Y., Learn, G.H., Rudicell, R.S., Robertson, J.D., Keele, B.F., Ndjongo, J.N., Sanz, C.M., Morgan, D.B., Locatelli, S., et al. (2011). Origin of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in gorillas. *467*, 420–425.
- Mackintosh, C.L., Beeson, J.G., and Marsh, K. (2004). Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol.* *20*, 597–603.

- Maier, A.G., Cooke, B.M., Cowman, A.F., and Tilley, L. (2009). Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 341–354.
- Marti, M., and Spielmann, T. (2013). Protein export in malaria parasites: many membranes to cross. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 445–451.
- Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E., and Cowman, A.F. (2004). Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 306, 1930–1933.
- Matthews, K., Kalanon, M., Chisholm, S. a, Sturm, A., Goodman, C.D., Dixon, M.W. a, Sanders, P.R., Nebl, T., Fraser, F., Haase, S., et al. (2013). The Plasmodium translocon of exported proteins (PTEX) component thioredoxin-2 is important for maintaining normal blood-stage growth. *Mol. Microbiol.* 89, 1167–1186.
- Miller, L.H., Ackerman, H.C., Su, X., and Wellems, T.E. (2013). Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat. Med.* 19, 156–167.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., and Rodríguez, a (2001). Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 291, 141–144.
- Murphy, S.C., Samuel, B.U., Harrison, T., Speicher, K.D., Speicher, D.W., Reid, M.E., Prohaska, R., Low, P.S., Tanner, M.J., Mohandas, N., et al. (2004). Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood* 103, 1920–1928.
- Oh, S.S., Voigt, S., Fisher, D., Yi, S.J., LeRoy, P.J., Derick, L.H., Liu, S., and Chishti, a H. (2000). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob-associated histidine-rich protein in the erythrocyte skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108, 237–247.
- Pachlatko, E., Rusch, S., Müller, A., Hemphill, A., Tilley, L., Hanssen, E., and Beck, H.-P. (2010). MAHRP2, an exported protein of Plasmodium falciparum, is an essential component of Maurer’s cleft tethers. *Mol. Microbiol.* 77, 1136–1152.
- Pei, X., Guo, X., Coppel, R.L., Bhattacharjee, S., Haldar, K., Gratzer, W., and An, X. (2007). The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of Plasmodium falciparum stabilizes spectrin tetramers and suppresses further invasion. 1036–1042.
- Poulsen, N.C., Spector, I., Spurck, T.P., Schultz, T.F., and Wetherbee, R. (1999). Diatom gliding is the result of an actin-myosin motility system. *Cell Motil. Cytoskeleton* 44, 23–33.
- Prugnolle, F., Durand, P., Ollomo, B., Duval, L., Ariey, F., Arnathau, C., Gonzalez, J.-P., Leroy, E., and Renaud, F. (2011). A fresh look at the origin of Plasmodium falciparum, the most malignant malaria agent. *PLoS Pathog.* 7, e1001283.
- Raventos-Suarez, C., Kaul, D.K., Macaluso, F., and Nagel, R.L. (1985). Membrane knobs are required for the microcirculatory obstruction induced by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 3829–3833.
- Riglar, D.T., Richard, D., Wilson, D.W., Boyle, M.J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., Angrisano, F., Marapana, D.S., Rogers, K.L., Whitchurch, C.B., et al. (2011). Super-resolution dissection

of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe* 9, 9–20.

Richard, D., MacRaild, C. a, Riglar, D.T., Chan, J.-A., Foley, M., Baum, J., Ralph, S. a, Norton, R.S., and Cowman, A.F. (2010). Interaction between Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J. Biol. Chem.* 285, 14815–14822.

Rosenberg, R., and Desai, S. (1997). Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. *94*, 2045–2049.

Rug, M., Prescott, S.W., Fernandez, K.M., Cooke, B.M., and Cowman, A.F. (2006). The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of P falciparum-infected human erythrocytes. *Blood* 108, 370–378.

Saul, A. (1999). The role of variant surface antigens on malaria-infected red blood cells. *Parasitol. Today* 15, 455–457.

Shen, B., and Sibley, L.D. (2012). The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 449–455.

Schofield, B.L., and Hackett, F. (1993). Signal Transduction in Host Cells by a Glycosylphosphatidylinositol Toxin of Malaria Parasites. *177*.

Spielmann, T., Montagna, G.N., Hecht, L., and Matuschewski, K. (2012). Molecular make-up of the Plasmodium parasitophorous vacuolar membrane. *Int. J. Med. Microbiol.* 302, 179–186.

Spycher, C., Rug, M., Pachlatko, E., Hanssen, E., Ferguson, D., Cowman, A.F., Tilley, L., and Beck, H.-P. (2008). The Maurer's cleft protein MAHRP1 is essential for trafficking of PfEMP1 to the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Mol. Microbiol.* 68, 1300–1314.

Srinivasan, P., Beatty, W.L., Diouf, A., Herrera, R., Ambroggio, X., Moch, J.K., Tyler, J.S., Narum, D.L., Pierce, S.K., Boothroyd, J.C., et al. (2011). Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13275–13280.

Staines, H.M., Powell, T., Thomas, S.L.Y., and Ellory, J.C. (2004). Plasmodium falciparum-induced channels. *Int. J. Parasitol.* 34, 665–673.

Su, X.Z., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J. a, Peterson, D.S., Ravetch, J. a, and Wellems, T.E. (1995). The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell* 82, 89–100.

Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J.H., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S., and Ménard, R. (1997). TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell* 90, 511–522.

Tonkin, M.L., Roques, M., Lamarque, M.H., Pugnère, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., and Boulanger, M.J. (2011). Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science* 333, 463–467.

Vlachou, D., Schlegelmilch, T., Runn, E., Mendes, A., and Kafatos, F.C. (2006). The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 384–391.

Waller, K.L., Nunomura, W., An, X., Cooke, B.M., Mohandas, N., and Coppel, R.L. (2003). Brief report Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) of Plasmodium falciparum binds to the 30kDa domain of protein 4.1 in malaria-infected red blood cells. *102*, 1911–1914.

Wickham, M.E., Rug, M., Ralph, S.A., Klonis, N., Mcfadden, G.I., Tilley, L., and Cowman, A.F. (2001). Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum -infected human erythrocytes. *20*.

Yeoh, S., O'Donnell, R. a, Koussis, K., Dluzewski, A.R., Ansell, K.H., Osborne, S. a, Hackett, F., Withers-Martinez, C., Mitchell, G.H., Bannister, L.H., et al. (2007). Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* 131, 1072–1083.