Fernanda Christtanini Koyama

**Caracterização de putativo receptor serpentino
e estudos sobre a implicação do sistema de
ubiquitina/proteossomo na modulação do ciclo
celular de *Plasmodium falciparum***

Tese apresentada ao Departamento de
Parasitologia no Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2012

Fernanda Christtanini Koyama

**Caracterização de putativo receptor serpentino e estudos sobre
a implicação do sistema de ubiquitina/proteossomo na modulação
o ciclo celular de *Plasmodium falciparum***

Tese apresentada ao Departamento de
Parasitologia no Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação
Patógeno-hospedeiro

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Célia Regina da Silva
Garcia

Versão corrigida: a versão original se encontra
arquivada no serviço de comunicação do ICB

São Paulo

2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Koyama, Fernanda Christtanini.

Caracterização de putativo receptor serpentino e estudos sobre a implicação do sistema de ubiquitina/proteossomo na modulação do ciclo celular de *Plasmodium falciparum* / Fernanda Christtanini Koyama. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Aspectos comparativos da regulação do ciclo celular de parasitas da malária

Versão do título para o inglês: Characterization of serpentine receptor putative and studies about the implication of ubiquitin/proteasome system in *Plasmodium falciparum* cell cycle.

1. Parasitologia 2. Malária 3. *Plasmodium* 4. Melatonina I. Garcia, Profa. Dra. Célia Regina da Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB050/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernanda Christtanini Koyama.

Título da Tese: Caracterização de putativo receptor serpentino e estudos sobre a implicação do sistema de ubiquitina/proteossomo na modulação do ciclo celular de *Plasmodium falciparum*.

Orientador(a): Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of. CEP SH. 030.11

PMAZ/mcgn

São Paulo, 29 de março de 2011.

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 113ª reunião realizada em 23.03.11, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Caracterização de putativo receptor serpentina. Implicação do sistema de ubiquitina/proteossomo na modulação do ciclo celular de Plasmodium falciparum*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi considerado *isento por não existir manipulação diretamente com seres humanos*.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma Sra.
FERNANDA CHRISTTANINI KOYAMA
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **019** nas fls. **43** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Célia Regina da Silva Garcia** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Aspectos comparativos da regulação do ciclo celular de parasitas da malária**" do qual participou o(s) alunos **Fernanda Christtanini Koyama**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em 27.02.2007.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2007.

Prof. Dr. CARLOS PELLESCI TABORDA
Vice - Coordenador da
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da
CEEA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Durante o meu processo de doutoramento tive a oportunidade de ter a colaboração de diversas pessoas, tal contribuição essa, que foi fundamental para o desenvolvimento da tese apresentada. Agradeço assim a professora Célia Garcia, por ter me aceito em seu laboratório prontamente e ter me possibilitado desenvolver um projeto tão desafiador.

Aos colaboradores diretos, Dr. Christian Doerig da Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suíça, por ter nos fornecido as linhagens de parasitas nocautes e complementados utilizados neste projeto e ao Dr. Debopam Chakrabarti da University of Central Florida, USA por ter me supervisionado durante estágio em seu laboratório.

Não poderia ainda deixar de agradecer aos membros do laboratório que contribuíram com conhecimento, apoio e amizade. Meu obrigado aos colegas Dr. Abhinay Sharma, Alexandre Budu, Bruno Cunha, Msc. Desirée Schuck, Eduardo Alves, Gloria da Silva, Henrique Borges, Dr. Julio Garcia, Dra. Laura Cruz, Lucas Borges, Dra. Myna Nakabashi, Dra. Miriam Moraes, Dr. Mauro de Azevedo, Dra. Pratibha Gaur, Dr. Piero Bagnaresi e Msc. Ramira Ribeiro.

Agradeço ainda o Hospital do Servidor Público pelas doações de sangue e plasma utilizados na manutenção da cultura de Plasmodium falciparum.

A FAPESP pelo financiamento.

A minha família pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu companheiro Mauro pelo incentivo e conforto nos momentos difíceis e pela alegria nos bons momentos.

As minhas amigas de sempre: Tatiane e a minha prima Jéssica, pelo incentivo e carinho.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento científico-profissional e pessoal.

Muito obrigada!

“Rien n'est plus fort qu'une idée dont l'heure est venue”

"Nada é tão poderoso quanto uma ideia cuja oportunidade chegou”

Vitor Hugo

RESUMO

Koyama, FC. Caracterização de putativo receptor serpentino e estudos sobre a implicação do sistema de ubiquitina/proteossomo na modulação do ciclo celular de *Plasmodium falciparum* [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

O ciclo de vida do protozoário *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária humana é um processo complexo que envolve diversas fases de desenvolvimento em diferentes células em que o parasita passa por mudanças bioquímicas e morfológicas que caracterizam cada estágio. Assim, é proposto que vias de sinalização controlem a sobrevivência e adaptação do parasita nos hospedeiros.

No presente trabalho buscamos por diferentes abordagens estudar a via de sinalização de melatonina em *P. falciparum*. Para isso, investigamos a participação de modificações pós-traducionais, avaliando os níveis de transcritos do sistema-ubiquitina proteossomo (UPS) bem como o perfil de ubiquitinação e de fosforilação de proteínas pela PKA (proteína quinase A). Além disso, mostramos que a proteína quinase 7 de *P. falciparum* (PfPK7) atua na modulação dos genes do UPS em resposta a melatonina.

Visto a responsividade do parasita não apenas a melatonina, mas a outros derivados de triptofano, na modulação do ciclo intraeritrocítico, avaliamos a responsividade do parasita ao ácido indol-3-acético (AIA). Contudo, as análises apresentadas mostram que AIA não leva as modificações observadas em resposta a melatonina ou outros derivados de triptofano anteriormente avaliados.

Sabendo-se da importância de receptores de membrana na regulação de diversas funções celulares incluindo a percepção do meio externo, buscamos caracterizar um receptor serpentino putativo identificado previamente pelo grupo. Para isto, analisamos a expressão gênica e localização subcelular. Os estudos funcionais foram impossibilitados uma vez que o nocaute do gene não foi obtido.

Dentre os resultados mais importantes, podemos concluir que a via de sinalização por melatonina em *P. falciparum* ocorre através de múltiplos eventos, envolvendo a participação da proteína quinase PK7 na modulação dos níveis de RNA mensageiros do UPS. Sugerimos fortemente também que modificações pós traducionais estejam relacionadas à modulação do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* uma vez que em parasitas nocautes para *pfpk7* não ocorre a modulação dos níveis de transcritos nem mesmo a modulação do ciclo intraeritrocítico.

Palavras chave: *Plasmodium falciparum*. Melatonina. Modificações pós-traducionais. Sinalização, Sistema Ubiquitina proteossomo, PfPK7

ABSTRACT

Koyama, FC. Characterization of serpentine receptor putative and studies about the implication of ubiquitin/proteasome system in *Plasmodium falciparum* cell cycle. [Ph. D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

The *Plasmodium falciparum* cycle, etiological agent of malaria, is a complex process that involves different stages of development in a myriad of cells. During the biological cycle, parasites develop through biochemical and morphologically changes that characterizes each stage. Thus, it is proposed that signaling pathways can control the parasite survival and adaptation into the host.

In the present work we have studied the melatonin signaling pathway through different methodologies. For this purpose we have analyzed post-translational modification of melatonin signaling, through ubiquitin-proteasome system (UPS) mRNA levels as well as the profile of ubiquitination and phosphorylation of parasites proteins by PKA (protein kinase A) resulted of melatonin treatment when compared with control. Moreover, we have found here that the *P. falciparum* protein kinase 7 (PfPK7) plays a major role in ubiquitin-proteasome system mRNA modulation in response to melatonin since parasites knockout to *pfpk7* gene do not upregulate the UPS genes in response to melatonin. However, complemented parasites restore this ability.

As melatonin, a vertebrate host hormone, and others tryptophan derivatives compounds modulates the parasite intraerythrocytic cycle, we have evaluated if *P. falciparum* parasites were responsive to indoleacetic acid, involved in plant grown and development regulation.

Last but not least, we made an effort to characterize a putative serpentine receptor, whereas the importance of membrane receptors on regulation of a range of cellular functions including the environment perception. The characterization of the putative receptor included the gene expression and cellular localization analysis. The gene function studies could not be performed since the putative receptor gene knockout was not successful.

Among the most important results we conclude that melatonin signaling pathway in *Plasmodium falciparum* occurs through multiple events, involving protein kinase 7 participation in gene transcription and/or stability of mRNA. We suggest also that post translational modifications are related to intraerythrocytic cycle modulation of *Plasmodium falciparum*.

Key words: *Plasmodium*. Melatonin. Post-translational modification. Signaling, *ubiquitin proteasome system*, *Plasmodium falciparum* kinase 7 (PfPK7).

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

5HTP - 5-hidroxi triptofano

6-Bz-cAMP - adenosina 3',5' monofosfato cíclico N6-benzoil

8-OH-DPAT - 8-hidroxi-N-(di-n-propil)-aminotetralina

AANAT – alquilamida-N-acetil transferase

AC – adenilato ciclase

AFMK - 1-acetil-N2-formil-5-methoxiquinuramina (N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine)

ANOVA – *analysis of variance*, análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

cAMP – adenosina monofosfato cíclico

ER – retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum*)

GPCR – receptor acoplado à proteína G (*G-protein coupled receptors*)

GTP – guanosina trifosfato

HIOMT- hidroxindole-O-metiltransferase

InsP₃ – inositol 1,4,5-trifosfato

kDa – quilodalton (unidade de massa atômica)

LB – *Luria Bertani* meio de cultura

M – molar

Mel – melatonina

MOPS – ácido 3-N-morfolino propanosulfônico

NAS - N-acetil serotonina

NEM – N-etilmaleimida

pb – pares de bases

PBS – solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*)

PDE – fosfodiesterase

Pf – *Plasmodium falciparum*

pH – potencial de hidrogênio

PLC – fosfolipase C

PK7 – proteína quinase 7

PKA- proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

SERCA – *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*

UBDs - ubiquitin binding domains

UPS – *ubiquitin-proteasome system*

m – mili

μ – micro

n –nano

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Áreas de risco de transmissão da malária no mundo. Em cinza, áreas de baixo risco de transmissão, em rosa, risco moderado, em vermelho claro, risco de transmissão moderado e em vermelho escuro, áreas com alto risco de transmissão.23
- Figura 2-** Ciclo biológico do *Plasmodium*.26
- Figura 3-** Síntese de melatonina durante a fase de escuro do ciclo circadiano nos pinealócitos de mamíferos.30
- Figura 4-** Estrutura de derivados de triptofano com anel indol em comum.32
- Figura 5-** Esquema ilustrativo da via de sinalização proposta para *P. falciparum*. AC adenilil ciclase, cAMP adenosina monofosfato cíclico, ER retículo endoplasmático, IP3 inositol trifosfato, IP3R receptor de inositol trifosfato, MAPK proteína quinase ativada por mitógeno, N núcleo, PKA proteína quinase A, PLC fosfolipase C, SR receptor serpentina, TF fatores de transcrição. Setas sólidas, indicam processos estudados e as setas pontilhadas indicam processos hipotéticos.34
- Figura 6-** Poliubiquitinação de proteínas para degradação via proteossomo. A, a ligação da molécula de ubiquitina ocorre em basicamente três passos enzimáticos, onde a E1 ativa a molécula de ubiquitina, transfere para uma E2 que então transfere a ubiquitina para E3 que ubiquitina o substrato. B, o substrato poliubiquitinado é então direcionado para o proteossomo onde sofre a ação de proteases e isopeptidases resultando na liberação de moléculas de ubiquitina e pequenos peptídeos.40
- Figura 7-** Representação esquemática dos diferentes tipos de ubiquitinação conhecidos com seus respectivos papéis nas atividades celulares.41
- Figura 8-** Localização dos *primers* para amplificação da porção homóloga (300 pb) a ser clonada no vetor de nocaute pCAM.52
- Figura 9-** Expressão relativa dos genes UPS em resposta a tratamento com melatonina 10 μ M em aproximadamente 24h pós-invasão, após 3, 4, 5 e 6 h de. A expressão de cada gene foi normalizada com a do gene 18S ribossomal. Ao menos três experimentos independentes foram realizados para cada ponto de tempo (ver tabela II) e cada um analisado por PCR em tempo real em triplicatas. A análise estatística foi realizada com os valores do $\Delta\Delta CT$ em $\log_2$ pelo teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$61
- Figura 10-** A- Expressão relativa dos genes UPS em resposta a tratamento com melatonina 100 nM em aproximadamente 24h pós invasão, após 5h de tratamento comparada e expressão do gene correspondente em parasitas tratados apenas com o solvente (etanol 0,00005%). B- Expressão relativa dos genes UPS em resposta a melatonina 100 nM em aproximadamente 24h pós invasão, após 5h de tratamento na presença de luzindole 250 μ M. A expressão de cada gene foi normalizada com a do gene 18S ribossomal. Ao menos três experimentos independentes foram realizados (ver tabela III) e cada um analisado por PCR em tempo real em triplicatas. A análise estatística foi realizada com os valores do $\Delta\Delta CT$ em $\log_2$ pelo teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$63
- Figura 11-** Expressão relativa dos genes UPS em resposta a tratamento com N-acetilserotonina 100 nM em aproximadamente 24h pós invasão, durante 5h de tratamento comparada e expressão do gene correspondente em parasitas tratados apenas com o solvente (etanol 0,00005%). A expressão de cada gene foi normalizada com a do gene 18S ribossomal. Ao menos três experimentos independentes foram

realizados (ver tabela IV) e cada um analisado por PCR em tempo real em triplicatas. A análise estatística foi realizada com os valores do $\Delta\Delta CT$ em $\log_2$ pelo teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$66

Figura 12- Análise da expressão relativa por PCR em tempo real de genes do UPS em resposta a tratamento com melatonina, em 24 h pós-invasão, em A- parasitas nocaute para o gene da *pfpk7* e B- parasitas complemento para a PfPK7 após 5h de tratamento com melatonina 100 nM comparados a expressão do gene correspondente em parasitas tratados apenas com o solvente (etanol 0,00005%). A expressão de cada gene foi normalizada com a do gene 18S ribossomal. Ao menos três experimentos independentes foram realizados (ver tabela V) e cada um analisado por PCR em tempo real em triplicatas. A análise estatística foi realizada com os valores do $\Delta\Delta CT$ em $\log_2$ pelo teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$69

Figura 13- Perfil de ubiquitinação de proteínas em *P. falciparum* tratado em estágio trofozoíta com melatonina 10 μM por 6h. A- *Western blot* com anti-ubiquitina, controle de loading, anti- β tubulina. B- Imunoprecipitação com anti-ubiquitina. * banda analisada por espectrometria de massa.74

Figura 14- *Western blots* (WB) de proteínas imunoprecipitadas (IP) com anticorpo para ubiquitina ou actina provenientes de parasitas tratados ou não com melatonina. Na ausência de anticorpos utilizados para imunoprecipitação pode-se observar proteínas ligadas inespecificamente as proteínas A/G sefarose.76

Figura 15- Expressão da beta tubulina durante os estágios intraeritrocíticos de *P. falciparum*. A- Dados de estudo de proteômica. Modificado de Le Roch, Johnson et al. 2004. B- Imunofluorescência indireta utilizando anticorpos para a beta tubulina em diluição 1:100 e anti IgG conjugado a Alexa 546 em diluição 1:300. O DAPI foi utilizado para marcação de DNA e assim permitir a visualização do(s) núcleo(s).77

Figura 16- A- Análise da expressão de beta tubulina durante 34 a 39 h pós invasão após 10-15 h de tratamento com melatonina 100 nM comparados ao controle (parasitas tratados apenas com o solvente etanol 0,00005 %) por imunoblot utilizando anticorpos específicos para a beta tubulina. Abaixo, controle de *loading* com membrana utilizada no experimento de imunoblot corada com *coomassie blue*. B- Densitometria das bandas normalizadas pelo respectivo *controle de loading* e subsequentemente pelo controle negativo. C- Contagem dos estágios intraeritrocíticos presentes em cada amostra analisada por imunoblot. Foram realizados três experimentos independentes sendo um deles representado aqui.79

Figura 17- Perfil de ubiquitinação de proteínas provenientes de parasitas tratados (+) ou não (-) com melatonina 100 nM. A- *Western blot* utilizando anticorpos para ubiquitina. Abaixo, a membrana corada com *coomassie blue* apresentada como controle de *loading*. B- densitometria de bandas analisadas pelo software Image Lab (BioRad). O eixo x corresponde à numeração das bandas em A com o respectivo ponto de tempo.....80

Figura 18- Imunoprecipitação de proteínas ubiquitinadas. A- Proteínas imunoprecipitadas coradas com *coomassie blue*. B- *Western blot* do extrato total com anticorpo para ubiquitina. C- Membrana contendo extrato total corada com *coomassie blue*. D- Densitometria das bandas 1 e 2. E- Quantificação das proteínas identificadas por espectrometria de massa da banda 2. Os valores no eixo Y se referem à contagem dos espectros normalizados por albumina, analisados pelo programa Scaffold 3.....82

Figura 19- A- Perfil de ubiquitinação de proteínas avaliado através de *Western blot* utilizando anticorpos para a ubiquitina de parasitas tratados com melatonina (100 nM) comparados com os parasitas tratados com melatonina (100 nM) na presença de luzindole (250 μM). Abaixo, membrana corada com *coomassie blue* utilizada como controle de *loading*. A seta indica onde as proteínas diferencialmente ubiquitinadas se encontram. B- Densitometria das bandas de interesse em 7h de tratamento normalizadas pelo *coomassie blue* e analisadas pelo programa Image J.....84

- Figura 20-** Perfil de fosforilação de substratos de PKA em parasitas tratados (+) ou não (-) com melatonina 100 nM em 5, 30 e 60 minutos após o tratamento. A- Western blot utilizando anticorpos para substratos de PKA fosforilados. B- Densitometria das bandas 1, 2 e 3 diferencialmente fosforiladas utilizando o programa Image Lab (BioRad).86
- Figura 21-** Perfil de distribuição da população de parasitas a partir da marcação de DNA com YOYO-1. A fluorescência é captada pelo filtro FL1-H. A população mononucleada representa os parasitas nos estágios de anéis e trofozoítos. A população de multinucleados representa os parasitas que se encontram no estágio de esquizonte do ciclo intraeritrocítico. A parasitemia é a soma das duas populações.88
- Figura 22-** Histogramas representativos dos experimentos de citometria de fluxo analisados após 24 h de tratamento com A- melatonina ou AIA e B- melatonina ou ambos AIA e melatonina. Em vermelho controle, em azul parasitas tratados com melatonina, e em verde, parasitas tratados AIA (A) ou tratados com AIA conjuntamente com melatonina (B). A demarcação dos *gates* foi realizada utilizando parasitas sincrônicos em anel e esquizonte durante a análise de cada experimento.89
- Figura 23-** Distribuição dos estágios intraeritrocíticos de *P. falciparum* em tratamento com ácido indol-3-acético (AIA) e melatonina (Mel). A – Comparação entre tratamentos com melatonina (Mel) e ácido indol-3-acético (AIA) separadamente. B - Comparação entre tratamentos com melatonina e ácido indol-3-acético conjuntamente. Análise estatística com ANOVA e pós teste de Newman Keuls, $p < 0,05$90
- Figura 24-** Parasitemia após tratamento de *P. falciparum* com melatonina (Mel), ácido indol-3-acético (AIA) ou ambos normalizados pelo controle.91
- Figura 25-** Expressão relativa dos genes UPS em resposta a tratamento com ácido indole-3-acético 100 nM em aproximadamente 24 h pós invasão, durante 5h comparados a expressão do gene correspondente em parasitas tratados apenas com o solvente. A expressão de cada gene foi normalizada com a do gene 18S ribossomal. Ao menos três experimentos independentes foram realizados (ver tabela VII) e cada um analisado por PCR em tempo real em triplicatas. A análise estatística foi realizada com teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$93
- Figura 26-** A- Perfil de ubiquitinação de proteínas de parasitas tratados com melatonina (100 nM) comparado aos parasitas tratados com AIA (100 nM). Abaixo, membrana corada com coomassie blue utilizada como controle de *loading*. A seta indica a posição das bandas analisadas por densitometria nas 3 condições testadas. B- Densitometria das bandas de interesse com aproximadamente 70 kDa em 8h de tratamento normalizadas pelo *coomassie blue* analisadas pelo programa Image J.95
- Figura 27-** A- Análise de motivos e domínios presentes na sequência de aminoácidos do PfSR12 (PFD1075w). Dados obtidos pelo Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan). B- Topologia do putativo receptor serpentina PfSR12. Predição dos domínios transmembrana utilizando o algoritmo TMHMM e localização do epítipo, na sequência de aminoácidos do PfSR12, selecionado para produção de anticorpo além dos motivos e domínios identificados pela análise do Motif Scan.98
- Figura 28-** A- RT-PCR do gene PFD1075w durante o ciclo intraeritrocítico. Tempo em horas pós-invasão B- Western blot do receptor PfSR12 (aproximadamente 65kDa) em parasitas assíncrônicos (à esquerda) e nos estágios A anel, T trofozoíto e E esquizonte (à direita). A membrana foi corada com *coomassie blue* como controle de *loading*. 100
- Figura 29-** Localização celular do receptor PfSR12 por imunofluorescência indireta em *P. falciparum*. A Controle negativo utilizando apenas o anticorpo secundário (anti IgG) conjugado ao alexa 488. B- Ensaios de imunofluorescência para o PfSR12 nos estágios anel, trofozoíto e esquizonte. Em verde, anti-PfSR12

utilizando-se anticorpo secundário anti-IgG conjugado a Alexa 488, em azul DAPI, em seguida sobreposição e contraste de fase. H, hemácia não infectada; A, anel; T, trofozoíto; E, esquizonte.....	103
Figura 30- Imunofluorescência indireta do receptor PfSR12 em <i>P. falciparum</i> utilizando células não permeabilizadas. Em verde, anti-PfSR12 utilizando-se anticorpo secundário anti-IgG conjugado a Alexa 488, em azul DAPI, em seguida sobreposição e contraste de fase.....	104
Figura 31- Imunofluorescência do receptor PfSR12 em <i>P. falciparum</i> tratados com brefeldina A 5µg ml ⁻¹ . Em azul DAPI, em verde anti-PfSR12 utilizando-se anticorpo secundário anti-IgG conjugado a Alexa 488, em sequência, sobreposição e contraste de fase.	105
Figura 32- Estrutura do plasmídeo pCAM_BSD_PFD1075w à esquerda. BSD, gene de resistência a blasticidina, AMP, gene de resistência à ampicilina, cam5' UTR e HRP2' UTR, promotor e terminador respectivamente que controlam a expressão do gene de resistência à blasticidina. Purificação do vetor (pCAM-BSD) e do inserto (PfSR12) digeridos com BamHI e PstI para posterior ligação.	106
Figura 33- Confirmação da construção do vetor de nocaute pCAM-BSD-PFD1075w. Canaletas 1,3,5 e 7 correspondem ao plasmídeo sem o inserto. Canaletas 2,4,6 e 8 correspondem ao plasmídeo com a região homóloga do gene PFD1075w inserido.	107
Figura 34- A- Esquema de recombinação do vetor pCAM-BSD-PFD1075w. E, EcoRV; H, HincII; N, Nco I. Acima o esquema do locus gênico, no centro o vetor de nocaute com a região homóloga e abaixo o locus gênico com a integração do plasmídeo. B- Análise de integração do plasmídeo no genoma por PCR de <i>P. falciparum</i> cepa 3D7 wild type (WT) e da cepa transfectada com o vetor de nocaute pCAM-BSD-PFD1075w. A-E correspondem às combinações dos oligonucleotídeos dados na tabela.	108
Figura 35- Perfil de abundância de transcritos de genes do sistema ubiquitina/proteossomo (selecionados para nosso estudo), durante ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i>	112

LISTA DE TABELAS

Tabela I- Genes UPS selecionados para análise por PCR em tempo real.	59
Tabela II- Análise por PCR em tempo real de genes do UPS após tratamento de <i>P. falciparum</i> com melatonina 10 μ M durante 3, 4, 5 e 6 horas. MER, média da expressão relativa em $\log_2$ ($\log_2\Delta\Delta CT$); DP, desvio padrão; N, número de experimentos independentes realizados.	62
Tabela III- Análise por PCR em tempo real de genes do UPS após tratamento de <i>P. falciparum</i> com melatonina 100 nM e na presença de luzindole 250 μ M durante 5 horas. MER, média da expressão relativa ($\log_2\Delta\Delta CT$); DP, desvio padrão; N, número de experimentos independentes realizados.	65
Tabela IV- Análise por PCR em tempo real de genes do UPS após tratamento de <i>P. falciparum</i> com N-acetilserotonina durante 5 horas. MER, média da expressão relativa ($\log_2\Delta\Delta CT$); DP, desvio padrão; N, número de experimentos independentes realizados.	67
Tabela V- Genes analisados por PCR em tempo real após tratamento com melatonina 100 nM durante 5 horas em parasitas <i>pfpk7</i> e PfPK7 complemento. MER, média da expressão relativa ($\log_2\Delta\Delta CT$); DP, desvio padrão; N, número de experimentos independentes realizados.	70
Tabela VI- Resumo dos genes analisados e correspondente modulação nas diversas condições em <i>P. falciparum</i> . Denominamos “sim” para o gene analisado que sofreu regulação positiva ou “não” para os que não sofreram regulação positiva.	72
Tabela VII- Proteínas diferencialmente imunoprecipitadas, utilizando-se anticorpos para ubiquitina, identificadas por espectrometria de massa.	75
Tabela VIII- Análise por PCR em tempo real de genes do UPS após tratamento de <i>P. falciparum</i> com ácido indol-3-acético 100 nM durante 5 horas. MER, média da expressão relativa (em $\log_2$); DP, desvio padrão; N, número de experimentos independentes realizados.	94
Tabela IX- Transportadores putativos substratos de PKA. Análise <i>in silico</i> realizada usando PkaPS.....	116

SUMÁRIO

1	Introdução	22
1.1	Malária	22
1.2	<i>Plasmodium</i> e seu ciclo biológico.....	24
1.3	Desenvolvimento intraeritrocítico sincrônico em espécies de <i>Plasmodium</i>	27
1.4	Sinalização por derivados de triptofano em <i>Plasmodium</i>	29
1.5	Mecanismos moleculares da sinalização por melatonina em <i>P. falciparum</i>	33
1.6	Participação de proteínas quinases na via de sinalização por melatonina	34
1.7	Receptores serpentinicos e sua participação na via de sinalização da melatonina	36
1.8	Papel da ubiquitinação de proteínas em transdução de sinal.....	38
2	Objetivos.....	44
3	Materiais e Métodos.....	45
3.1	Manutenção de <i>P. falciparum</i> em cultura e sincronização por sorbitol	45
3.2	Discriminação dos estágios intraeritrocíticos por citometria de fluxo	46
3.3	Western blot e imunoprecipitação	47
3.3.1	Análise da expressão do PfSR12	47
3.3.2	Análise do perfil de proteínas ubiquitinadas	48
3.3.3	Análise do perfil de proteínas fosforiladas	49

3.4	Imunofluorescência indireta	50
3.5	Construção de vetor de nocaute pCAM-BSD_PFD1075w	51
3.5.1	<i>Extração de DNA de P. falciparum</i>	51
3.5.2	<i>Reação da polimerase em cadeia (PCR)</i>	52
3.5.3	<i>Clonagem</i>	53
3.5.4	<i>Sequenciamento de DNA</i>	54
3.6	Transfecção.....	55
3.7	PCR em tempo real	56
4	Resultados.....	58
4.1	Modulação dos genes do sistema ubiquitina/proteossomo (UPS) pela melatonina	58
4.1.1	<i>Modulação dos genes do UPS em resposta a N-acetil serotonina</i>	66
4.1.2	<i>Parasitas pfpk7 são irresponsivos à melatonina quanto à modulação do UPS</i>	68
4.1.3	<i>Perfil de ubiquitinação de proteínas em resposta à melatonina</i>	72
4.2	Fosforilação de proteínas pela PKA em resposta à melatonina.....	85
4.3	Análise da responsividade de parasitas da malária ao ácido indol-3-acético (AIA)	87
4.3.1	<i>Avaliação da distribuição dos estágios intraeritrocíticos após tratamento com AIA</i>	87
4.3.2	<i>Modulação dos genes do UPS em resposta ao AIA</i>	92
4.4	Caracterização do putativo receptor serpentina PfSR12.....	96
4.4.1	<i>Expressão do receptor PfSR12 durante o ciclo intraeritrocítico</i>	99
4.4.2	<i>Localização celular do PfSR12</i>	102
4.4.3	<i>Genética reversa para o gene do putativo receptor serpentina PFD1075w</i>	105

5	Discussão	110
5.1	Implicação do sistema ubiquitina/proteossomo em resposta a melatonina.....	110
5.2	Participação de proteínas quinases na via de sinalização de melatonina	114
5.3	Irresponsividade de <i>P. falciparum</i> ao ácido indol-3-acético ?.....	117
5.4	Caracterização de receptores serpentinos em <i>Plasmodium</i>	119
6	Conclusões	124
	Referências	125
	Anexos.....	136

1 Introdução

1.1 Malária

A Organização Mundial da Saúde estima que a malária cause mais de 1 milhão de mortes e de aproximadamente 500 milhões de casos clínicos por ano. Além disso, a malária afeta o desenvolvimento social e econômico dos países endêmicos devido à morbidez causada nas vítimas infectadas.

Cerca de 40% da população encontra-se em áreas de risco de transmissão da malária. As áreas mais atingidas são os países tropicais e subtropicais compreendidos na África, no sudeste Asiático e na América (principalmente a América do Sul) (**Figura 1**). No Brasil, a região da Amazônia legal, compreendida pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, é a mais atingida.

O agente etiológico da malária é o protozoário do gênero *Plasmodium* pertencente ao filo Apicomplexa. O filo Apicomplexa compreende um grupo de protozoários, alguns dos quais são responsáveis por importantes doenças humanas que afetam principalmente os países em desenvolvimento. Este grupo inclui além do *Plasmodium*, os gêneros: *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Theileria* e *Cryptosporium*. *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporium parvum*, por exemplo, são agentes etiológicos da toxoplasmose e criptosporidíase, respectivamente.

São conhecidas muitas espécies de plasmódios que podem infectar uma série de hospedeiros vertebrados, como aves, répteis, e mamíferos. Dentre as espécies que infectam o homem são conhecidas quatro: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e

Plasmodium malariae. Em 2008, entretanto, infecções naturais por *P. knowlesi*, espécie conhecida por infectar macacos, foram descritas em humanos na Malásia (Cox-Singh, Davis et al., 2008).

No Brasil, predominam infecções causadas por *P. vivax*, que embora seja responsável por menor mortalidade que *Plasmodium falciparum*, causa considerável morbidez. Além disso, as infecções causadas por *Plasmodium vivax* podem levar a recaídas da infecção semanas depois do episódio inicial devido à presença de hipnozoítos (Krotoski, Collins et al., 1982).

Na África por outro lado, há predominância de infecções por *P. falciparum*, responsável pela forma mais severa da doença.

Figura 1- Áreas de risco de transmissão da malária no mundo. Em cinza, áreas de baixo risco de transmissão, em rosa, risco moderado, em vermelho claro, risco de transmissão moderado e em vermelho escuro, áreas com alto risco de transmissão.

Fonte: NASA Malaria Atlas Project – 2007.

Uma característica interessante das infecções por *P. falciparum* é a evasão do sistema imune através das proeminências formadas na membrana dos eritrócitos infectados conhecidas como *knobs*, que permite à célula aderir-se ao endotélio vascular de forma que o parasita consegue evitar a passagem pelo baço. O resultante sequestro de eritrócitos infectados em capilares de determinados órgãos representa um importante fator na fatalidade em pacientes de malária (MacPherson, Warrell et al., 1985).

Embora esforços sejam voltados para erradicação da doença, a resistência a antimaláricos e a diversidade antigênica do agente etiológico tem sido os principais obstáculos.

1.2 *Plasmodium* e seu ciclo biológico

O *Plasmodium* possui um ciclo biológico complexo que compreende duas fases distintas: a fase assexuada, onde os parasitas se encontram no hospedeiro vertebrado, e a fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado anofelino. Em cada fase, o parasita sofre mudanças morfológicas e bioquímicas, podendo assim ser classificado em cada estágio do seu ciclo biológico.

O ciclo assexuado inicia-se com a picada e injeção de saliva, contendo esporozoítos, pela fêmea do mosquito *Anopheles*. Alguns destes esporozoítos invadem capilares sanguíneos enquanto outros se dirigem aos vasos linfáticos (Amino, Thiberge et al., 2006). Os esporozoítos que entraram na corrente sanguínea atravessam os sinusóides do fígado (Ishino, Yano et al., 2004) e então, após atravessarem várias células hepáticas, invadem os hepatócitos (Mota, Pradel et al., 2001, Coppi, Tewari et al., 2007) e a partir de um processo denominado de esquizogonia hepática, produzem um grande número de merozoítos. Foi observado em espécies murinas de *Plasmodium* que os merozoítos saem dos hepatócitos envoltos por vesículas derivadas da célula hospedeira (merossomos) (Sturm, Amino et al., 2006). Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos estão aptos a invadirem os eritrócitos, iniciando-se o ciclo intraeritrocítico, fase onde a patologia da malária se manifesta.

O processo de invasão de eritrócitos inicia-se com a adesão do parasita na célula hospedeira seguida pela reorientação do merozoíto onde a região apical está adjacente ao eritrócito e então ocorre uma ligação entre os receptores e ligantes de ambas as células com alta afinidade, e

a formação de um sistema motor actina-miosina fazendo com que o merozoíto migre para o interior do eritrócito (Cowman, Crabb, 2006). Durante a invaginação, o parasita inverte a membrana da hemácia originando o vacúolo parasitóforo. Diversas proteínas são secretadas criando assim um ambiente apropriado para seu desenvolvimento (Aikawa, Miller, 1983, Bannister, Mitchell, 1989). Após invadir o eritrócito, o parasita se desenvolve passando por diversas modificações bioquímicas e morfológicas, podendo ser discriminado em três estágios principais denominados: anel, trofozoíto e esquizonte.

O estágio de anel é assim denominado devido à morfologia apresentada. O estágio de trofozoíto é o período de maior atividade metabólica onde também ocorre a primeira replicação de DNA. Em esquizonte, através de um processo denominado esquizogonia, ocorre uma série de mitoses ainda não caracterizada completamente, originando até 32 merozoítos (dependendo da espécie) que rompem os eritrócitos e invadem novas hemácias reiniciando o ciclo intraeritrocítico (Bannister, Mitchell, 2003). Alguns parasitas, entretanto, após invadirem o eritrócito, diferenciam-se em gametócitos que podem infectar um novo mosquito vetor quando a fêmea do mosquito *Anopheles* realiza hematofagia em uma vítima infectada. No mosquito então ocorre o ciclo sexuado do parasita.

Figura 2- Ciclo biológico do *Plasmodium*.

Fonte: Modificado de: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image Library/ Malaria_il.htm.

Dentro do hospedeiro invertebrado, os eritrócitos infectados com as formas assexuadas de *Plasmodium* são digeridos, com exceção daqueles infectados com gametócitos. As condições de pH e temperatura, diferentes das do hospedeiro vertebrado (Sinden, 1983) e, fatores como ácido xanturênico, presente no vetor anofelino, fazem com que os gametócitos diferenciem-se em gametas masculino e feminino (Billker, Lindo et al., 1998). Cada gametócito masculino origina oito gametas e, após sofrer exflagelação, cada um dos oito gametas une-se a um gameta feminino

para formar o zigoto no intestino do mosquito e, subsequentemente se desenvolve em oocineto que migra para a parede externa do intestino do hospedeiro e diferencia-se em oocisto. Através de divisões mitóticas, o oocisto origina um grande número de esporozoítos que então, após migrarem para a glândula salivar, estão aptos a infectar um novo hospedeiro vertebrado reiniciando o ciclo assexuado (**Figura 2**).

1.3 Desenvolvimento intraeritrocítico sincrônico em espécies de *Plasmodium*

A periodicidade dos ataques febris na malária, característica da doença, está relacionada à liberação simultânea de merozoítos na circulação sanguínea resultante da sincronia dos estágios intraeritrocíticos do parasita (Hawking, 1970). O ritmo dos parasitas da malária foi definido por Hawking em 1975 como “ritmo circadiano dependente da sincronia da divisão celular dos parasitas de acordo com um padrão de 24, 48, ou 72 h”.

Ainda que a sincronia seja observada *in vivo*, ela é perdida *in vitro* sugerindo que sinais do hospedeiro poderiam mantê-la (Trager, Jensen, 1976). Um desses fatores poderia ser a temperatura, que varia no organismo durante o ciclo de 24 h, além da variação causada pela febre (Kwiatkowski, 1989). Fatores como a diversidade alélica (Toure-Ndouo, Zang-Edou et al., 2009) e a resposta imune do hospedeiro também parecem estar relacionados à sincronia do parasita (Rouzine, McKenzie, 2003). Boyd em 1929, estudando uma espécie de *Plasmodium* que infecta aves, o *Plasmodium cathemerium*, observou que o ciclo intraeritrocítico era modulado pelo ciclo claro/escuro do hospedeiro (Boyd, 1929). Taliaferro e Taliaferro em 1934 mostraram que o ciclo assexuado de *Plasmodium brazilianum*, espécie que infecta macacos, também é modulado pelo ciclo claro/escuro do hospedeiro (Taliaferro, 1934).

Nosso grupo de pesquisa mostrou então que derivados de triptofano como N-acetilserotonina, serotonina, triptamina, melatonina e seu produto metabólico N1-acetil-N2-formil-5-methoxiquinuramina (AFMK), são capazes de modular o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum in vitro* e *P. chabaudi in vivo* (Hotta, Gazarini et al., 2000, Hotta, Markus et al., 2003, Beraldo, Garcia, 2005, Budu, Peres et al., 2007).

Em *P. chabaudi*, espécie que infecta camundongos, a ruptura e reinvasão das hemácias ocorrem entre meia noite e três horas da manhã, período que coincide com o pico dos níveis de melatonina, majoritariamente produzida pela glândula pineal em vertebrados. Quando os camundongos são submetidos à inversão do ritmo claro/escuro, a esquizogonia então passa a ocorrer próximo ao meio dia (Cambie, Landau et al., 1990, Gautret, Deharo et al., 1995). Além disso, camundongos pinealectomizados infectados com *P. chabaudi* apresentam uma população assincrônica de parasitas. A sincronia é restaurada com a administração de melatonina exógena, efeito este que é abolido na presença de luzindole, um antagonista de receptores de membrana para a melatonina (Hotta, Gazarini et al., 2000).

Em adição, experimentos *in vitro* com *P. falciparum* mostraram que a adição de melatonina ao meio de cultura leva a um aumento da população de esquizontes (Hotta, Gazarini et al., 2000). Interessantemente nenhum efeito na resposta a modulação do ciclo é observado em *P. berghei* e *P. yoelii* (espécies consideradas assincrônicas) quando tratados com melatonina (Bagnaresi, Alves et al., 2009).

Uma das hipóteses para a sincronia destes parasitas seria um possível mecanismo de evasão do sistema imune oferecendo ao parasita uma vantagem no momento da reinvasão. Estudos mostram que a perturbação do ritmo circadiano do hospedeiro pela alteração do ciclo claro/escuro, afeta o desenvolvimento sincrônico de *P. chabaudi* e causa uma diminuição de até 50% na invasão

dos eritrócitos (O'Donnell, Schneider et al., 2011). Além disso, o tratamento com luzindole em conjunto a cloroquina (antimalárico) aumenta a sobrevivência de camundongos infectados com *P. chabaudi* (Bagnaresi, 2008).

O ritmo circadiano do hospedeiro vertebrado parece estar também envolvido no aumento das populações de gametócitos circulantes na corrente sanguínea. Hawking observou em 1970 que a produção de gametócitos de *P. knowlesi* aumentava durante a noite, período que coincide com o horário da hemofagia dos anofelinos. Esse efeito foi então chamado “efeito Hawking” (Garnham, Powers, 1974).

1.4 Sinalização por derivados de triptofano em *Plasmodium*

A modulação do ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* em resposta a melatonina também pode ser alcançada com derivados de triptofano precursores da melatonina como N-acetilserotonina, serotonina e com o produto de degradação da melatonina, o AFMK (Beraldo, Garcia, 2005, Budu, Peres et al., 2007).

A melatonina está intimamente relacionada ao controle do ritmo circadiano de diversos organismos embora também participe de diferentes funções celulares, atuando, por exemplo, como antioxidante (Reiter, Acuna-Castroviejo et al., 2001). Este hormônio pode ser sintetizado em diversas células e tecidos como na retina, na medula óssea, no trato intestinal, gônadas e em células do sistema imune (Bubenik, 1980, Tan, Manchester et al., 1999, Guerrero, Reiter, 2002) embora a produção em mamíferos ocorra majoritariamente pela glândula pineal.

A síntese de melatonina pela glândula pineal ocorre a partir do triptofano que é hidroxilado pela enzima triptofano 5-hidroxilase passando a 5-hidroxi triptofano (5HTP). A 5HTP carboxilase converte o 5HTP em serotonina. A serotonina é então acetilada pela alquilamida-N-

acetil transferase (AANAT) produzindo assim a N-acetil serotonina (NAS). Finalmente, a enzima hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT) converte a NAS em melatonina (5-metoxi acetil triptamina) (**Figura 3**) (Reiter, Tan et al., 2011).

Figura 3- Síntese de melatonina durante a fase de escuro do ciclo circadiano nos pinealócitos de mamíferos.

Fonte: Modificado de (Reiter, Tan et al., 2011).

O que determina a síntese de melatonina durante a noite é o impedimento da degradação da AANAT pelo proteossomo, uma vez que os níveis aumentados de AMPc causado pela ativação de receptores $\beta 1$ através da ligação da norepinefrina liberada nos pinealócitos pelo neurônio simpático pós-ganglionar, levam a ativação da PKA que fosforila a AANAT tornando-a estável além de induzir a transcrição do gene da AANAT através da fosforilação e consequente ativação do fator de transcrição CREB (Klein, Berg et al., 1970, Gastel, Roseboom et al., 1998, Reiter, Tan et al., 2011).

Embora a melatonina seja conhecida por ser sintetizada em vertebrados, esta indolamina também pode ser sintetizada por organismos filogeneticamente distantes como bactérias, fungos, plantas, e invertebrados (Hardeland, 1999, Reiter, Tan et al., 2001, Hardeland, Poeggeler, 2003). Em *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, a melatonina afeta a diferenciação em formas metacíclicas (Macias, Rodriguez-Cabezas et al., 1999).

O genoma de *Plasmodium falciparum* apresenta maior similaridade com o de plantas, como *Arabidopsis thaliana*, do que com o de outros parasitas (Gardner, Hall et al., 2002) e, proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs), até então exclusivas para plantas, foram encontradas em *Plasmodium* e possivelmente estão envolvidas no controle de ciclo celular (Harper, Harmon, 2005). Além disso, a presença do plastídio também confere ao parasita outra semelhança com células vegetais (McFadden, Reith et al., 1996, Wilson, Denny et al., 1996).

O ácido indol-3-acético (AIA) também conhecido como auxina é um fitormônio, derivado de triptofano que possui estrutura similar a melatonina (**Figura 4**). Muito estudado em plantas, possui funções diversas, atuando inclusive no crescimento, diferenciação e desenvolvimento de células vegetais, além de ter vias de sinalização reguladas pelo ritmo circadiano (Covington, Harmer, 2007). Em *Lupinus albus*, a melatonina pode desempenhar algumas atividades

relacionadas ao ácido indol-3-acético, estimulando crescimento de elongação numa concentração similar à concentração responsiva do ácido indol-3-acético (Hernandez-Ruiz, Cano et al., 2004).

Interessantemente, as vias de sinalização por fitormônios (grupo que inclui o ácido indol-3-acético, o ácido abscísico, a citocinina, a giberelina, o etileno além de brassinosteróides e do jasmonato), envolvem quase sempre o sistema de ubiquitina/proteossomo (Santner, Estelle, 2009). Por exemplo, os receptores para ácido indol-3-acético e jasmonato são proteínas do sistema ubiquitina/proteossomo, conhecidas como proteínas F-box (Dharmasiri, Dharmasiri et al., 2005, Thines, Katsir et al., 2007) que serão melhor discutidas adiante.

Em *Arabidopsis thaliana*, a via de sinalização por AIA inclui a ubiquitinação e posterior degradação proteossomal de repressores de transcrição de genes envolvidos no crescimento (Kepinski, Leyser, 2004).

Figura 4- Estrutura de derivados de triptofano com anel indol em comum.

1.5 Mecanismos moleculares da sinalização por melatonina em *P. falciparum*

A capacidade de perceber o meio externo tem papel importante na modulação do ciclo celular e na diferenciação do *Plasmodium*. Quando os parasitas são tratados com melatonina ou com derivados de triptofano como N-acetilserotonina, serotonina, triptamina além do produto de degradação da melatonina, AFMK ocorre liberação de cálcio de estoques intracelulares (através de uma fosfolipase C) e aumento da concentração intracelular de AMP cíclico (Beraldo, Garcia, 2005, Budu, Peres et al., 2007).

A via de sinalização por melatonina em *Plasmodium* exige uma interação altamente complexa entre as vias de sinalização de Ca^{2+} e AMPc (Beraldo, Almeida et al., 2005). Essa interação pode afetar as concentrações de segundos mensageiros em comum e permitir um ajuste mais fino da regulação da atividade celular do que poderia a ação de vias individuais.

O aumento de AMPc pela melatonina é bloqueado pelo inibidor de fosfolipase C, U73122 enquanto que a adição de 6-Bz-cAMP (adenosina 3',5' monofosfato cíclico N6-benzoil) aumenta a concentração de Ca^{2+} citossólico através da ativação da proteína quinase PKA (Gazarini, Beraldo et al., Beraldo, Almeida et al., 2005). A adição do inibidor clássico da PKA, PKI, abole o efeito da melatonina nesses parasitas tanto na modulação do cálcio citossólico quanto dos estágios do ciclo intraeritrocítico (Gazarini, Beraldo et al., Beraldo, Almeida et al., 2005). Além disso, o tratamento de *P. falciparum* com melatonina é capaz de ativar uma cisteína-protease dependente de cálcio (Farias, Gazarini et al., 2005). Assim foi proposta uma via de sinalização em *P. falciparum* (**Figura 5**).

Figura 5- Esquema ilustrativo da via de sinalização proposta para *P. falciparum*. AC adenilil ciclase, cAMP adenosina monofosfato cíclico, ER retículo endoplasmático, IP3 inositol trifosfato, IP3R receptor de inositol trifosfato, MAPK proteína quinase ativada por mitógeno, N núcleo, PKA proteína quinase A, PLC fosfolipase C, SR receptor serpentina, TF fatores de transcrição. Setas sólidas, indicam processos estudados e as setas pontilhadas indicam processos hipotéticos.

Fonte: Modificado de (Koyama, Chakrabarti et al., 2009).

1.6 Participação de proteínas quinases na via de sinalização por melatonina

As diferentes fases de desenvolvimento do parasita compreendem complexos ciclos de crescimento celular, dos quais se estima que as proteínas quinases sejam moduladores fundamentais (Koyama, Chakrabarti et al., 2009).

A participação de processos de modificações pós-traducionais em vias de sinalização é bem conhecida. Nosso grupo identificou a participação de pelo menos três proteínas quinases de

P. falciparum: PKA, PfPK7 e PfeIK1, na modulação do ciclo intraeritrocítico por melatonina (Beraldo, Almeida et al., 2005, Ribeiro, 2010).

A PfPK7 (proteína quinase 7, PFB0605w) de *P. falciparum* é uma proteína órfã que possui alta similaridade a MAPKK (*mitogen-activated protein kinase kinase* ou MEK) na região C-terminal enquanto que a N-terminal tem maior similaridade a proteína quinase A (PKA) (Dorin-Semlat, Sicard et al., 2008) além de ter uma estrutura similar a MAPKKK (Merckx, Echalié et al., 2008). Contudo, PfPK7 é insensível tanto a inibidores de MEK quanto de PKA (Dorin, Semlat et al., 2005).

O nocaute do gene *pfpk7* leva a um crescimento lento no ciclo intraeritrocítico, causado pela redução do número de merozoítos produzidos na esquizogonia, além de bloquear a formação de oocistos no mosquito vetor (Dorin-Semlat, Sicard et al., 2008).

Nosso grupo de pesquisa, analisando parasitas nocautes para o gene da *pfpk7*, observou que a resposta à melatonina é abolida no que concerne à modulação do ciclo, e há uma diminuição da liberação de cálcio intracelular efeitos estes que são restaurados com a complementação do gene *pfpk7* (Koyama, Ribeiro et al., 2011).

A PfeIK1, fator de iniciação eucariótico quinase, fosforila *in vitro*, a eIF2 α ortóloga de *P. falciparum* em resposta a privação de aminoácidos (Fennell, Babbitt et al., 2009). Da mesma forma que para parasitas nocautes para o gene da *pfpk7*, os parasitas nocautes para a PfeIK1 são irresponsivos à melatonina.

Já a participação da PKA na via de sinalização da melatonina foi avaliada, como citado anteriormente, tratando-se o parasita com PKI, um inibidor comumente usado em mamíferos que também impede a uma modulação do ciclo intraeritrocítico em resposta a melatonina (Beraldo, Almeida et al., 2005).

Assim, modificações pós-traducionais como a fosforilação parecem ter um papel fundamental na sinalização por melatonina em *P. falciparum*.

1.7 Receptores serpentinos e sua participação na via de sinalização da melatonina

Receptores celulares apresentam um grupo de proteínas essenciais para a regulação de diversas funções na célula. Os receptores podem ser classificados de acordo com diversas características, como a estrutura secundária, atividade catalítica, entre outras. Dentre os receptores de membrana conhecidos estão os receptores acoplados a proteína G (GPCR) ou receptores serpentinos, os receptores canais e os receptores que possuem atividade enzimática como os receptores tirosina quinase.

Os receptores serpentinos compreendem a classe de receptores mais conservados em eucariotos, sendo encontrados também em fungos (Dohlman, Thorner et al., 1991), plantas (Plakidou-Dymock, Dymock et al., 1998) e protozoários (New, Wong, 1998). Em vertebrados, os receptores tipo GPCR representam mais de 1% do genoma enquanto que em *Caenorhabditis elegans*, aproximadamente 5% do genoma codifica para receptores GPCRs (Bargmann, 1998).

Esta classe de receptores está envolvida em uma grande variedade de processos fisiológicos e apresentam como ligantes moléculas que variam desde pequenos peptídeos, íons e luz até hormônios e neurotransmissores.

Os receptores GPCR ou serpentinos são caracterizados pela presença de sete domínios transmembrana e podem ser classificados em até seis subfamílias, sem semelhança na sequência de aminoácidos (Bockaert, Pin, 1999).

Receptores para a melatonina conhecidos em mamíferos estão localizados na membrana plasmática, são pertencentes à família de GPCR denominados MT1 e MT2. Evidências funcionais,

farmacológicas, bioquímicas e moleculares sugerem que os receptores para a melatonina são heterogêneos (Dubocovich, 1995).

Estudos relatam também a existência de receptores não GPCR para a melatonina como o MT3, análogo à quinona redutase tipo 2 identificados em células de mamíferos (Nosjean, Ferro et al., 2000, Mailliet, Ferry et al., 2005). Devido à hidrofobicidade da melatonina, o hormônio pode atravessar as membranas celulares e se ligar a proteínas intracelulares como o receptor MT3, já citado, receptores nucleares da família de receptores de ácido retinóico (Wiesenberg, Missbach et al., 1998) além da calmodulina (Benitez-King, Huerto-Delgadillo et al., 1993), ainda que essa interação seja controversa (Ouyang, Vogel, 1998).

Embora receptores do tipo GPCR sejam encontrados em protozoários (New, Wong, 1998), o conhecimento sobre receptores de membrana em *Plasmodium* continua escasso. Através de análise bioinformática, nosso grupo revelou a presença de quatro putativos receptores serpentinicos: PfSR1, PfSR10, PfSR12 e PfSR25 contendo sete domínios transmembrana (Madeira, Galante et al., 2008).

Dentre os receptores serpentinicos identificados pelo nosso grupo, o PfSR10 e o PfSR25 se mostraram mais conservados em relação às outras espécies de *Plasmodium* comparadas, enquanto que o PfSR1 e PfSR12 são os mais divergentes (Madeira, Galante et al., 2008). Através de análise de similaridade de sequência de aminoácidos por BLAST, foi mostrado que o PfSR10 possui homólogos em diversas espécies incluindo outros protozoário, fungos e plantas. Já o PfSR12 possui homologia a receptores tipo GPR180 (Madeira, Galante et al., 2008). Em humanos, o gene para GPR180 codifica para um receptor GPCR tipo rodopsina, relacionado ao remodelamento vascular (Iida, Tanaka et al., 2003).

A via clássica de sinalização por melatonina via GPCR está relacionada à ativação da proteína G, entretanto, ainda que não haja evidências da existência da proteína G trimérica no genoma de *Plasmodium*, foi reportado que o parasita possivelmente utilize a proteína G expressa pelos eritrócitos (Lauer, VanWye et al., 2000). Por outro lado, algumas publicações afirmam que processos mediados por receptores serpentinicos poderiam ocorrer independentemente da proteína G (Hall, Premont et al., 1999).

A transmissão de informações por sinalizações mediadas por GPCRs podem ser moduladas por diferentes vias. A participação de processos de fosforilação é bem conhecida, mas a partir da última década, vários estudos tem mostrado que essas vias de sinalização poderiam ser reguladas também por ubiquitinação em resposta a ativação de receptores tipo GPCR levando assim a regulação de diversos processos (Wojcikiewicz, 2004).

1.8 Papel da ubiquitinação de proteínas em transdução de sinal

A ligação covalente da molécula de ubiquitina (um peptídeo altamente conservado composto por 76 aminoácidos) em proteínas está atualmente relacionada com a regulação de praticamente todos os processos celulares de eucariotos. O sistema de degradação de proteínas via ubiquitina/proteossomo (UPS) desempenha papéis diversos em eucariotos incluindo controle de ciclo celular, regulação de transcrição e transdução de sinal (Hershko, Ciechanover, 1998).

A ubiquitinação de proteínas envolve, de forma geral, três passos enzimáticos que envolvem três principais classes de enzimas: E1 enzima ativadora de ubiquitina, E2 enzima conjugadora de ubiquitina e E3 ubiquitina ligase.

De forma simplificada, a ubiquitina é ativada após se conjugar à E1, numa ligação tioéster, na qual ocorre a adenilação da glicina C-terminal da molécula de ubiquitina, de forma ATP-

dependente. A ubiquitina ativada é então transferida para a E2 e então em conjunto com a E3, a ubiquitina é ligada ao substrato pela região C-terminal a um grupo ϵ -amino da lisina do substrato, em uma ligação isopeptídica (Hershko, Ciechanover, 1998). O substrato ubiquitinado por sua vez pode ser reconhecido e degradado pelo proteossomo (**Figura 6**).

Podemos citar ainda o processo de de-ubiquitinação catalisado pelas deubiquitinasas, enzimas estas que pertencem ao grupo de cisteína proteases ou zinco-metaloproteases (Ponts, Yang et al., 2008) que removem a molécula de ubiquitina dos substratos. O papel destas enzimas é atualmente pouco conhecido entretanto sabe-se que mutações no gene codificante para uma deubiquitinase está relacionado a resistência a cloroquina e artesunato em *P. chabaudi* (Hunt, Afonso et al., 2007).

As E3 ubiquitina ligases, na maioria das vezes, são responsáveis pelo reconhecimento do substrato, e podem atuar sozinhas ou em complexos como o SCF (*SKP1, cullin and F-box*) e APC (*Anaphase promoting complex*). Dentre as proteínas pertencentes ao grupo das E3s, podemos citar as proteínas F-box, U-box, as culinas, as proteínas com domínio HECT (*Homologous to E6-AP C-Terminus*) e RING (*Really Interesting New Gene*). Por este motivo é comum a identificação de um número reduzido de E1 e E2 no genoma quando comparados ao número de E3 identificados (Hershko, Ciechanover, 1998).

O 26S proteossomo é um complexo protéico multimérico altamente conservado composto pela unidade 20S que possui atividade proteolítica devido à presença de diferentes proteases além de dois complexos 19S que possuem atividade regulatória e formam o *cap* (Ciechanover, 1998). Após o reconhecimento do substrato ubiquitinado, o proteossomo leva a degradação da proteína alvo em peptídeos e a reciclagem das moléculas de ubiquitina (Ciechanover, 1998).

Figura 6- Poliubiquitinação de proteínas para degradação via proteossomo. A, a ligação da molécula de ubiquitina ocorre em basicamente três passos enzimáticos, onde a E1 ativa a molécula de ubiquitina, transfere para uma E2 que então transfere a ubiquitina para E3 que ubiquitina o substrato. B, o substrato poliubiquitinado é então direcionado para o proteossomo onde sofre a ação de proteases e isopeptidases resultando na liberação de moléculas de ubiquitina e pequenos peptídeos.

Embora a degradação de proteínas seja o papel mais conhecido pela ubiquitinação de proteínas, este não é o único. De forma similar à fosforilação, o sinal de ubiquitinação das proteínas é reconhecido como domínios específicos (*Ubiquitin Binding Domains*, UBDs) de proteínas receptoras. Assim, diferentes tipos de ubiquitinação podem ser percebidos por diferentes

efetores. Dentre eles está a formação de cadeias de ubiquitina através de lisinas específicas da molécula de ubiquitina e a forma como a ubiquitina é ligada ao substrato. De acordo com cada tipo de ligação das moléculas de ubiquitina, diferentes topologias são formadas possibilitando à célula distinguir os sinais e promover as diferentes respostas celulares (**Figura 7**) (Woelk, Sigismund et al., 2007).

Figura 7- Representação esquemática dos diferentes tipos de ubiquitinação conhecidos com seus respectivos papéis nas atividades celulares.

Fonte: Modificado de (Woelk, Sigismund et al., 2007)

Predições *in silico* identificaram em *Plasmodium* 114 genes codificantes para diversos componentes do sistema de ubiquitina/proteossomo, número este dez vezes menor ao número de genes codificantes para os mesmos componentes em *Arabidopsis thaliana* (Ponts, Yang et al., 2008). Dentre os genes identificados, nove correspondem a ubiquitina ou ubiquitina-like, oito

genes correspondem à E1 ou enzima ativadora de ubiquitina, quatorze genes codificantes para E2 ou enzimas conjugadoras de ubiquitina, cinquenta e quatro E3 ou ubiquitinas ligases e vinte e nove deubiquitinases (Ponts, Yang et al., 2008).

Dentre as E3, quatro genes codificam para E3 da subfamília HECT, dois genes codificantes para E3 da subfamília das culinas, três genes codificantes para E3 da subfamília das U-box, três genes codificantes para F-box e quarenta e dois genes pertencentes ao grupo das RING finger (Ponts, Yang et al., 2008).

Podemos assim observar uma proporção de genes codificantes para o UPS em *Plasmodium* de forma correlata ao que ocorre para outros eucariotos. O controle do ciclo celular pelo complexo APC por outro lado, parece ser atípico (Ponts, Yang et al., 2008). Considerando-se, porém que o ciclo celular de *Plasmodium* apresenta características peculiares, a compreensão do UPS pode ser de grande importância para o entendimento do controle do ciclo celular do parasita da malária.

Em *P. falciparum*, ocorre a ativação da expressão de genes do proteossomo durante o estágio de esquizonte (Bozdech, Llinas et al., 2003) sugerindo um importante papel no desenvolvimento do parasita, que é consistente com o bloqueio do desenvolvimento tanto de *P. falciparum* quanto *P. berghei* por inibidores de proteossomo, aparentemente fundamental para a fase de replicação de DNA (Lindenthal, Weich et al., 2005, Reynolds, El Bissati et al., 2007, Kreidenweiss, Kremsner et al., 2008).

Podemos encontrar na literatura muitos reguladores de ciclo celular e diferenciação de diversos organismos que fazem parte do sistema de ubiquitina/proteossomo. As proteínas F-box, por exemplo, estão envolvidas em transdução de sinal, ciclo celular e desenvolvimento de plantas (Dharmasiri, Dharmasiri et al., 2005). Podemos citar ainda a participação do complexo SCF e consequentemente de proteínas F-box na morfogênese de fungos (Kornitzer, 2006). Em

Trypanosoma brucei, as proteínas F-box atuam no crescimento do parasita, e a CFB2 especificamente, é crucial para a citocinese do parasita na forma intraeritrocítica (Kumar, Wang, 2005, Benz, Clayton, 2007). Inibidores de proteossomo também afetam o desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* em amastigotos (de Diego, Katz et al., 2001) e em tripomastigotos metacíclicos (Cardoso, Soares et al., 2008). Ainda, inibidores de proteossomo bloqueiam o crescimento e proliferação de *Toxoplasma gondii* sugestivamente através da inibição da replicação do DNA (Shaw, He et al., 2000). De forma similar, em *Schistosoma mansoni*, o tratamento com inibidores de proteossomo inibe a produção de ovos através da redução da população de esquistossômulas no fígado (Guerra-Sa, Castro-Borges et al., 2005).

Diversos compostos atuam como inibidores de proteossomo, e a maioria deles interfere na atividade proteolítica do complexo 20S ligando-se aos sítios catalíticos. Dentre eles podemos citar MG-132, (Adams, Behnke et al., 1998), lactacistina (Dick, Cruikshank et al., 1996), NLVS (Bogyo, McMaster et al., 1997), eponemicina (Meng, Kwok et al., 1999), epoxomicina (Meng, Mohan et al., 1999), TMC-95A (Goldberg, Rock, 2002), e bortezomib (Adams, Kauffman, 2004). Interessante mencionar é que alguns destes compostos, como o bortezomib, não somente já foram testados em humanos como são utilizados em tratamentos de câncer, por exemplo. Desta forma, a utilização destes compostos no tratamento de diversas doenças parasitárias, seja de forma combinada a outros fármacos ou não, é promissora.

2 Objetivos

Os objetivos desta tese baseiam-se no estudo da via de sinalização de melatonina em *P. falciparum*.

Assim, analisamos efeitos *downstream* da via de sinalização de melatonina, mais especificamente, modificações pós-traducionais como a participação do sistema de ubiquitina/proteossomo (UPS), avaliando-se o nível de transcritos de genes do UPS e o perfil de ubiquitinação de proteínas do parasita como também eventos de fosforilação em resposta à melatonina em *P. falciparum*.

Dada a participação da proteína quinase 7 (PK7) na via de sinalização de melatonina em *P. falciparum*, no presente trabalho, avaliamos a modulação dos níveis de transcritos de genes do UPS em parasitas nocautes para o gene da *pfpk7*.

Além disto, visto a responsividade do parasita a diversos derivados de triptofano, avaliamos aqui a resposta de *P. falciparum* ao ácido índole-3-acético quanto a modulação do ciclo intraeritrocítico, a modulação dos níveis de transcritos do UPS assim como o perfil de ubiquitinação de proteínas.

Nos propusemos também a estudar um dos quatro putativos receptores serpentinicos identificados por nosso grupo, PfSR12 (Madeira, Galante et al., 2008), independentemente da via de sinalização da melatonina. Essa caracterização incluiria i) o nocaute deste gene por recombinação homóloga, ii) análise da expressão gênica e iii) localização subcelular.

3 Materiais e Métodos

3.1 Manutenção de *P. falciparum* em cultura e sincronização por sorbitol

Parasitas 3D7 foram mantidos em meio RPMI 1640 (GIBCO) com 0,04 % de sulfato de gentamicina (SIGMA), 0,05 % de hipoxantina (SIGMA), 0,23 % de bicarbonato de sódio (SIGMA) suplementado com 10 % de soro humano em hematócrito de 2 %. Os parasitas *pfprk7* foram mantidos da mesma forma porém com adição de blasticidina (SIGMA) (2,5 µg ml⁻¹) e, para os parasitas complementados, além de blasticidina foi adicionado o antibiótico WR99210 (5 nM). Após a troca do meio, as garrafas foram ventiladas com uma mistura de gás (7 % de CO₂, 5 % de O₂ e 88 % de N₂) (Trager, Jensen, 1976) e mantidas em estufa a 37 °C.

Bolsas de hemácias e plasma humano foram doadas pelo Centro de Hemoterapia do Hospital do Servidor Público (São Paulo, SP, Brasil) para manutenção dos parasitas em cultura.

Para análise de parasitemia e sincronia além de contagem de estágios, os esfregaços foram corados com panótico (Rápido LB) ou com Giemsa e aproximadamente 1000 células foram analisadas.

Os parasitas nocautes e complementados para o gene da *pk7* de *P. falciparum* utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Christian Doerig, da Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Suíça.

A sincronização dos estágios intraeritrocíticos foi realizada através do tratamento com sorbitol 10 %. Para isso, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 10 X o volume do pellet de sorbitol 10 % concentrado. Após incubação de 15 minutos e centrifugação (2.000 g por 5 minutos) o sorbitol é retirado. Adicionou-se então RPMI completo e as células. O processo foi

repetido entre 3 a 4 vezes até que seja observada sincronia de aproximadamente 80 % da população de parasitas.

3.2 Discriminação dos estágios intraeritrocíticos por citometria de fluxo

As análises por citometria de fluxo foram baseadas em (Schuck, Ribeiro et al., 2011). Foram feitas incubações em placas de cultura com concentrações diferentes de melatonina ou ácido indoleacético (100 nM, 1 μ M e 10 μ M) em meio RPMI completo com 1 % de hematócrito. A parasitemia inicial usada variou entre 1-3 %.

Após incubação por 24 h a 37 °C, as células foram lavadas 1 vez em PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM NaH₂PO₄), com centrifugação de 3.700 rpm por 1 minuto. As células foram fixadas em 2 % de formaldeído em PBS em temperatura ambiente por 24 h. Após a fixação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS para retirar completamente o formaldeído utilizado. Antes de serem levadas ao citômetro de fluxo, foram ressuspensas em solução contendo 0,1 % de triton X-100 para permeabilizar as células e 1 nM do marcador de ácido nucléico, YOYO-1. Após 20 minutos de incubação a 37 °C, as células foram analisadas. Os experimentos foram feitos em duplicatas e com N experimental >3.

A leitura foi feita no equipamento de citometria de fluxo FACSCalibur (BD - *Becton, Dickinson and Company*), onde foram coletadas 10⁵ células dentro do *gate* demarcado. A excitação do YOYO-1 foi feita utilizando o laser de comprimento de onda 488 nm e sua emissão em 509 nm captada pelo filtro FL1-H (503/530).

Para demarcação dos *gates* dos estágios de parasitas foram utilizadas as culturas sincronizadas nos estágios de anel e esquizontes, além dos eritrócitos não infectados. As análises foram feitas utilizando o programa Cyflogic.

3.3 Western blot e imunoprecipitação

3.3.1 Análise da expressão do PfSR12

Para caracterizar a expressão endógena do receptor PfSR12, experimentos de *Western blot* foram realizados utilizando anticorpos produzidos contra o epítipo DEKCLLIKEG da proteína sintetizado pela Proteimax, a partir de coelhos imunizados.

Os parasitas foram isolados do eritrócito através do tratamento com 0,1 % de saponina em 20 ml de tampão PBS acrescido de inibidores de protease (leupeptina, pepstatina A, antipaina e quimostatina a 20 µg/ml). Para a extração de proteínas, adicionou-se o tampão de lise RIPA (*Radio Immuno Precipitation Assay*) (1 % NP-40, 1 % deoxicolato de sódio, 0,1 % SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) na presença de inibidores de protease. Após a lise o extrato protéico foi resolvido em gel de SDS Page 12 %. As proteínas foram transferidas para membranas PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*) a 300 mA durante 2 horas. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Tween 0,1 %, pH 7,4) *overnight* a 4°C sob agitação. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-PfSR12 numa diluição de 1:1.000 com 1 % de BSA (albumina de soro bovino) em PBS durante 1 hora a 37 °C sob agitação. Subsequentemente as membranas foram lavadas por 3 vezes durante 10 minutos com TBS-T e então foram incubadas com o

anticorpo secundário anti-IgG numa diluição 1:20.000 com leite desnatado diluído 5 % em TBS-T por 1 hora a 37 °C sob agitação. Outras 3 lavagens foram realizadas e então as membranas foram reveladas utilizando ECL plus (Amershan).

3.3.2 *Análise do perfil de proteínas ubiquitinadas*

Para caracterizar o perfil de ubiquitinação de proteínas, parasitas sincrônicos no estágio trofozoíto (aproximadamente 24 h pós-invasão) foram tratados com melatonina (10 μ M ou 100 nM) e após o período de incubação (que variou de 6-9 h, ver na seção de Resultados) foram isolados do eritrócito através do tratamento com 0,1 % de saponina em 20 ml de tampão PBS acrescido de inibidores de proteases. Para a extração de proteínas em tratamento com 10 μ M de melatonina utilizou-se o tampão de lise *Freeze/Thaw* (600 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,8, 20% glicerol) na presença de inibidores de protease, 100 nM de inibidor de proteossomo, bortezomib (Millennium Pharmaceuticals) e 20 mM de inibidor de deubiquitinação N-etilmaleimida (NEM). Para as extrações com tratamento com melatonina a 100 nM, utilizamos o tampão de lise com 8 M uréia, 75 mM NaCl, 50 mM Tris pH8,2. Após a lise, centrifugou-se por 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e a porção solubilizada do extrato protéico foi quantificada pelo método Bradford. Foram aplicados 50 μ g de proteína em gel de SDS Page 10 %. As proteínas foram transferidas para membranas PVDF (Polyvinylidene Difluoride) a 300 mA durante 2 horas. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Tween 0,1%, pH7,4) *overnight* a 4 °C sob agitação. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-ubiquitina (Sigma Aldrich) numa diluição de 1:5.000 com 1% BSA (albumina de soro bovino) em PBS durante 1 hora a 37 °C sob agitação. Subsequentemente as membranas foram lavada por 3 vezes de 10 minutos com TBS-T e então

incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG numa diluição 1:20.000 com leite desnatado diluído 5 % em TBS-T por 1 hora a 37 °C sob agitação. Outras 3 lavagens foram realizadas e as membranas foram então reveladas utilizando ECL plus (Amersham).

Para os experimentos de imunoprecipitação de proteínas ubiquitinadas bem como o de imunoprecipitação cruzada (actina e ubiquitina), utilizamos as proteínas A e G sefarose (Amersham). O extrato protéico (500 µg) foi previamente incubado com a resina para evitar a análise de proteínas imunoprecipitadas inespecificamente. As amostras então foram incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpo específico. Sequencialmente adicionou-se as proteínas A e G sefarose que foram conjuntamente incubados por 4 h a 4 °C. Após lavagens, a eluição do anticorpo foi realizada com glicina 0,1 M pH 3.5 posteriormente neutralizada com 0,5 M Tris HCl pH 7,4 e NaCl 1,5M. O imunoprecipitado foi resolvido em SDS Page e o gel corado com *coomassie blue*. A banda de interesse foi enviada a *Tufts University Core Facility, EUA* para análise por espectrometria de massa.

3.3.3 Análise do perfil de proteínas fosforiladas

Para caracterizar o perfil de fosforilação de proteínas de parasitas sincrônicos no estágio trofozoíto (aproximadamente após 24 h de invasão) tratados com melatonina 100 nM, foram isolados do eritrócito através do tratamento com 0,1 % de saponina em 20 ml de tampão PBS acrescido de inibidores de proteases. Para a extração de proteínas utilizamos o tampão de lise M-PER (Thermo Scientific). Após a lise o extrato protéico foi quantificado (pelo método de Bradford) e 50 µg de proteína foram aplicados em gel de SDS Page 10 %. As proteínas foram transferidas membranas PVDF (Polyvinylidene Difluoride) a 300 mA durante 2 horas. As

membranas foram bloqueadas com 5 % de leite desnatado em TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Tween 0,1%, pH7,4) *overnight* a 4 °C sob agitação. O imunoblot foi realizado como descrito anteriormente.

Para os experimentos de imunoprecipitação, 500 µg de proteínas foram previamente incubadas com a resina para evitar a análise de proteínas imunoprecipitadas inespecificamente pela resina. Após o *pré-clearing* as proteínas foram imunoprecipitadas na presença de anticorpos anti-substratos de PKA fosforilados (Cell Signaling) de acordo com o fabricante (Pierce®Crosslink Immunoprecipitation Kit). Uma pequena porção do eluído foi utilizada em experimentos de *Western blot*. As bandas 1 e 2 foram analisadas por espectrometria de massa na *Proteomics Facility da University of Florida, EUA*.

3.4 Imunofluorescência indireta

Os ensaios de imunofluorescência indireta realizados foram baseados no método descrito por Tonkin et al. (Tonkin et al. 2004). Assim os eritrócitos infectados foram fixados com paraformaldeído 4 % e glutaraldeído 0,0075 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram então permeabilizadas com Triton X-100 0,1 %, por 30 minutos e bloqueadas com BSA 3 % por 1 hora a temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram utilizados a uma diluição de 1:50 – 1:100 em BSA 1 % *overnight* a 4 °C. Após lavagens, os anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado a Alexa-Fluo 488 ou 546 foram adicionados numa diluição de 1:300 em BSA 1 % por 1 hora a temperatura ambiente. Após novas lavagens as células foram incubadas com DAPI (1:500) em PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. A aquisição das imagens

foi feita com o microscópio confocal LSM510 (Carl Zeiss), usando o software LSM510 versão 2.5.

Para os tratamentos com brefeldina A, parasitas predominantemente na fase jovem (anel a trofozoíto jovem) foram tratados com $5\mu\text{g ml}^{-1}$ de brefeldina A por 3 h e preparados como citado acima.

3.5 Construção de vetor de nocaute pCAM-BSD_PFD1075w

3.5.1 Extração de DNA de *P. falciparum*

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de parasitas isolados dos eritrócitos através da adição de saponina. Após agitação cuidadosa por 5 min foi adicionado 1 ml de PBS e o *pellet* contendo os parasitas foi obtido após centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. Após lavagem com PBS, adicionou-se ao *pellet* 200 μl de solução para lise das células (10 mM Tris-HCl pH8.0, 5 mM EDTA pH8.0, 100 mM NaCl, SDS 0,5 % e Proteinase K 0,2 mg ml^{-1}). Após incubação a 50 °C *overnight* adicionou-se 250 μl de TE-Fenol e incubou-se por 10 minutos sob agitação. A amostra foi centrifugada a 13.000 rpm durante 10 minutos e à fase aquosa foi adicionado 250 μl de TE-Fenol/Clorofórmio, novamente incubado por 10 min sob agitação. Após nova centrifugação, à fase aquosa foi adicionado 250 μl de Clorofórmio/Álcool isoamílico (24:1) incubando-se por 10 minutos sob agitação.

Para precipitação do DNA, foi adicionado à fase aquosa 20 μl de 3 M acetato de sódio (pH 5.2) e 500 μl de etanol gelado (100 %) incubando-se *overnight* a -20 °C. Centrifugou-se então a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Ao *pellet* adicionou-se 500 μl de etanol 75 % gelado.

Após nova centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi seco a 37 °C. Ao *pellet* seco foi adicionada água milliQ autoclavada para ressuspensão. O DNA foi então tratado com RNase e analisado em gel de agarose.

3.5.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Para a construção do vetor pCAM-BSD-PFD1075w, amplificamos uma região de 300 pb da porção 5' da ORF do SR12 (**Figura 8**) utilizando os seguintes *primers*:

F-PstI ctgcagATGATAAGAAGAAAGTGGAG

R-BamHI ggatccCCATATATAACTTTTGAAGATACC

Figura 8- Localização dos *primers* para amplificação da porção homóloga (300 pb) a ser clonada no vetor de nocaute pCAM.

As amplificações ocorreram na presença de 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 2,5 µl de tampão 10X concentrado, 1 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,25 µl de Taq polimerase, 1 µl de cada primer (10 µM) e 100 ng µl⁻¹ de DNA genômico em volume total de 25 µl, nas seguintes condições: denaturação inicial 94 °C 5 min, denaturação 94 °C 0,5 min, anelamento 58 °C 1,5 min, extensão 60 °C 1 min, 60 °C 10 min 4 °C ∞ por 35 ciclos.

Para os experimentos de RT PCR do PfSR12, utilizamos os primers:

F: ATGATAAGAAGAAAGTGGAGTA

R: TTAATTTAAATCTAAATATGGATGTTTCG

As condições de amplificação ocorreram nas mesmas condições citadas acima.

3.5.3 Clonagem

Para purificar o amplificado separados em gel de agarose 1 %, utilizamos o kit de purificação PureLink™ Gel Extraction Kit (Invitrogen) segundo protocolo do fabricante.

O amplificado foi clonado em pGEM-T-easy (Promega) para que a quantidade de inserto e a eficiência de subclonagem sítio dirigida aumentasse. Para a reação de ligação, foram adicionados 3 µl de tampão 2 vezes concentrado (pGEM-T-easy *cloning kit*), 1 µl do vetor (50 ng), 1 µl de T4 ligase (3 unidades µl⁻¹) mais 5 µl de produto de PCR purificado. 1 µl da ligação foi transformada em bactérias eletrocompetentes (XL10-gold). Para analisar as colônias, isolamos os plasmídeos pela metodologia de *mini-preparation* (Birnboim, Doly, 1979) que consiste na lise alcalina com SDS.

Assim, colônias foram isoladamente crescidas em meio *Luria Bertani* (LB) contendo antibiótico ampicilina (100 µg ml⁻¹) a 37 °C *overnight*. Após o período de crescimento das bactérias, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 10.000 rpm. O meio foi descartado e o *pellet* foi lavado em 300 µl de solução I (50 mM glicose, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0 na presença de RNase. Adicionou-se 300 µl de solução II (0,2 M NaOH e 1 % SDS) para lise das células. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, foi adicionado a solução III (3 M de acetato de potássio, 11,5 % de ácido acético glacial) para neutralização, incubando-se

por 10 minutos em gelo. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 4 °C a 10.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e adicionados 500 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) para reduzir a contaminação do DNA purificado com proteínas. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 4 °C por 2 minutos a 10.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 500 µl de isopropanol para precipitação do DNA. Após lavagem com etanol 70 % e secagem, o *pellet* de DNA foi ressuscitado em água milliQ autoclavada.

Após extração do DNA plasmidial das colônias analisadas, o DNA foi digerido com enzimas de restrição específicas, (PstI, BamHI), para liberar o inserto que foi purificado do gel de agarose com o *Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen) seguindo-se o protocolo do fabricante, e inserido no vetor pCAM-BSD numa proporção aproximada de 1:3 (vetor para inserto) com a enzima T4 ligase (Invitrogen) na presença de tampão 2x concentrado.

A subclonagem foi analisada por enzimas de restrições, e os plasmídeos positivos para as digestões foram então seqüenciados pelo método de Sanger.

3.5.4 Sequenciamento de DNA

Para a reação de sequenciamento, foram adicionados 1 µl de BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), 2 µl de tampão 5x, 1 µl de primer (10 µM), 1 µl de DNA (100 nM) e 5 µl de água nas seguintes condições: denaturação inicial 96 °C por 1 min, denaturação 96 °C por 15 seg, anelamento 50 °C por 15 seg, extensão 60 °C por 4 min, 30 ciclos.

O amplificado foi precipitado adicionando-se 90 µl de isopropanol 66% submetido à centrifugação por 1 hora a 4 °C 3.700 rpm. Posteriormente, 150 µl de etanol 75 % foram

adicionados e as amostras foram centrifugadas por 30 min a 4 °C a 3.700 rpm. Após secagem do *pellet* as amostras foram enviadas para sequenciamento no Serviço de Sequenciamento de DNA – SSDNA do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Para nos certificarmos de que não havia alteração no inserto de interesse, as sequências obtidas no sequenciamento foram comparadas com a referência (obtida no banco de dados Plasmodb) utilizando-se o programa SeqMan II (DNASTar).

3.6 Transfecção

As transfecções foram realizadas segundo metodologia descrita por Deitsch (Deitsch et al. 2001) nas condições de eletroporação previamente estabelecidas por Fidock e Wellens (Fidock et al. 1997). As hemácias e o DNA foram lavados em CytoMix (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH7,6, 25 mM Hepes, pH7,6) e submetidos à eletroporação (capacitância 950 µf e voltagem 0,31 KV). Após 48 horas, os parasitas transfectados foram tratados com a droga seletiva. Devido a baixa eficiência de transfecção (aproximadamente 10⁻⁶) houve uma diminuição drástica das células infectadas. Após 1 semana os parasitas recuperados foram mantidos na presença de droga seletiva. Os ciclos de drogas ocorreram mantendo-se os parasitas na ausência de droga seletiva por 3 semanas e na presença da droga seletiva por mais 3 semanas. Repetiu-se por 3 vezes e então a integração do plasmídeo no cromossomo correspondente foi avaliada por PCR.

3.7 PCR em tempo real

Para os experimentos de PCR em tempo real, *Plasmodium falciparum* (3D7) sincronizados foram tratados com melatonina (Sigma Aldrich), luzindole (Tocris Bioscience), N-acetil serotonina (Sigma Aldrich) ou ácido indole-3-acético (Sigma Aldrich) em aproximadamente 24 horas após a invasão. As amostras foram coletadas nos pontos correspondentes e o RNA foi extraído com Trizol (Invitrogen) subsequentemente tratado com DNase I (Invitrogen).

Para a síntese de cDNA utilizamos *primers* randômicos e transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen) de acordo com o fabricante. Para reação de PCR, utilizou-se 10 µM de cada *primer* específico para cada gene analisado (ver **Tabela I**), 40 ng de cDNA por *well* e 1x de SYBR *green master mix* no volume final de 25 µl.

A ciclagem de temperatura utilizada foi: 95 °C 5 minutos, 55 °C 30 segundos, 60 °C 30 segundos por 40 ciclos.

A incorporação de SYBR *green* foi mensurada durante a amplificação realizada no 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem) em triplicatas. A eficiência de amplificação dos *primers* (desenhados pelo programa Primer 3) para cada gene foi previamente validada através da equação: $Eficiência = \left[\left(10^{-1/slope} \right) - 1 \right] 100$ onde o *slope* é o ângulo da curva padrão. Valores de eficiência entre 90 a 120 % foram aceitos.

Para as análises estatísticas por teste *t* de Student, aplicamos os valores da expressão relativa pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001) em $\log_2$ para comparar a expressão de cada gene com seu respectivo controle, ambos normalizados com o gene constitutivo 18S ribossomal. Os valores de $\Delta\Delta CT$ são dados da seguinte forma:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (amostra) - \Delta CT (controle) e$$

$\Delta CT = CT \text{ gene de interesse} - CT \text{ gene endógeno}$ sendo CT o valor de *cycle threshold*.

As análises estatísticas foram realizadas com os valores do $\Delta\Delta CT$ em $\log_2$ pelo teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 Resultados

4.1 Modulação dos genes do sistema ubiquitina/proteossomo (UPS) pela melatonina

Propomos que o sistema de ubiquitina/proteossomo poderia ser afetado pelo tratamento com melatonina uma vez que este sistema está envolvido em diversas funções celulares, incluindo transdução de sinal, regulação do ciclo celular entre outros. Além disso, vias de sinalização por fitormônios correm via sistema de ubiquitina/proteossomo (Santner, Estelle, 2009).

Após evidências sobre a modulação de alguns genes do UPS em *P. falciparum* por melatonina em experimento de microarranjo realizado pelo nosso grupo, avaliamos a expressão relativa de 14 genes dessa via por PCR em tempo real (**Tabela I**). Sabendo-se que o número total de genes codificantes para o UPS é de aproximadamente 114 genes (Ponts, Yang et al., 2008), nossa análise consiste em aproximadamente 13% dos genes codificantes para o UPS.

Os critérios para seleção dos genes analisados consistiram em: i) genes que representassem as três enzimas do processo clássico de ubiquitinação, *i. e.* E1, E2 e E3, incluindo as E3 do complexo SCF, envolvido no controle de ciclo celular, ii) subunidades do proteossomo e iii) proteínas ubiquitinas-like. Além disso, incluímos genes que não codificam proteínas envolvidas no UPS, utilizados aqui como controle (ver **tabela I**).

Tabela I- Genes UPS selecionados para análise por PCR em tempo real.

Genes	ID	Oligonucleotídeos	Grupo
PF11_0177	Ubiquitina C-terminal hidrolase	F TGGCGAGGGATAATGAAAAC R GAAATTTCTGTAGCACCCATACG	Deubiquitinase
PFL1790w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	F CAATGATCAATTGGAAATGCAC R CATATTTCTTCGACCTGCATA	E1
PFL1245w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	F TCAGGTGCTTTAGGATGTGAA R AGTTTACCACAACAAGCCAAA	
PFL0190w	E2 enzima conjugadora de ubiquitina	F CAGCAGGAGCAATATGTCTTGA R TGCGTTGGGGTCTGTTAGTA	E2
PFL1565c	Proteína hipotética contendo domínio F-box	F AGTCAACGAAAGGTACCCAAA R TTCCTCATGTTACATTTTTCG	E3
PFF0960c	Proteína hipotética contendo domínio F-box	F TGAATACAAACAGCGTAAAAGA R AGGTGCTACTTCTTCTCCACA	
PFC0845c	Ubiquitina ligase	F GGGGGTATGTAATCATGCTTTTC R GGCTTTTGAATTCCTCAAGT	
MAL8P1.23	Ubiquitina ligase	F TGGCAATGGAGAAAATGATG R TGACTGGCGCAGATGTTAA	
MAL13P1.337	Skp1	F GCGTCAAACTATCTTGATATT R AAACCTCCGCTCGAATTTCTTC	
PF08_0094	Culina-like	F GATCCAAATTTCAACGAATGC R TTTTCATCAACGCTGTTTTC	
PFF1445c	Culina-like	F TGATATGGGACCAACAACCTCA R TTCTTTCTGATGATTTTCCATTTG	
PF14_0025	Subunidade do proteossomo, putativo	F GCCACATATGAGCGATGAGTT R TTGCATCACCTTCTCATTTCG	Subunidade de proteossomo
PFA0400c	Subunidade do proteossomo Beta-3, putativo	F TGAACCTTATCTCACGGCATA R ACACATTCCAAAAGCTGTTCA	
PFI1085w	Ubiquitina-like	F TCAACCCCTATGCCAAATA R CTTCATCGGGAACCTCTTCA	Ubiquitina-like
PFI1485c	Diacylglicerol quinase	F AGATATACATGAAAAGGATGATGCATACG R ACAATCTTCATTTATCAGATCCATGATC	Controles (não UPS)
PF13_0252	Transportador de nucleosídeo 1	F AGCCAAGAAAAAGAAAGAAAT R ATTGTGTTACATCGATGGGT	
MAL13P1.216	DNA helicase	F AAATGTGCAGACGATTATTTC R CAAAGGAGATTTGTTTCTTTC	

Para avaliar se a adição de melatonina alteraria os níveis de transcritos do UPS, adicionou-se melatonina 10 µM ao meio de cultura de *P. falciparum* sincronizados (ver materiais e métodos) 24-30h após-invasão. Como controle, parasitas tratados apenas com solvente (etanol 0,00005%) foram utilizados. Este período de tratamento foi escolhido uma vez que o trabalho de Hotta *et al.* 2000 mostrou o efeito da melatonina em parasitas que se encontram nesta fase do ciclo

intraeritrocítico (trofozoíta). Os parasitas foram mantidos na presença de melatonina (ou do solvente) durante 3, 4, 5 e 6 horas.

Através destes experimentos, observamos que alguns desses genes eram regulados positivamente apenas após 4 e 5 horas de tratamento com melatonina (10 μ M) (**Figura 9**).

Após 4 horas de tratamento com melatonina (10 μ M), os genes PF11_0177 (Ubiquitina C-terminal hidrolase), PFL1790w (E1 enzima ativadora de ubiquitina), PFF0960c (Proteína hipotética contendo o domínio F-box), MAL8P1.23 (Ubiquitina ligase), PFF1445c (Culina-like), e PF14_0025 (Subunidade do proteossomo) foram regulados positivamente.

Já após 5 horas de tratamento com melatonina (10 μ M), os genes PF14_0025 (Subunidade do proteossomo) e PFF1445c (Culina-like) deixam de ser regulados positivamente em relação a 4 horas de tratamento. Por outro lado, os genes PFL1245w (E1 enzima ativadora de ubiquitina), PFL1565c (Proteína hipotética contendo o domínio F-box) e PF08_0094 (Culina-like) passam a ser regulados positivamente após 5 horas de tratamento diferencialmente ao tratado por 4h enquanto que os genes PF11_0177 (Ubiquitina C-terminal hidrolase), PFL1790w (E1 enzima ativadora de ubiquitina), PFF0960c (Proteína hipotética contendo o domínio F-box), MAL8P1.23 (Ubiquitina ligase) são regulados positivamente tanto em 4 quanto em 5 horas após o tratamento com melatonina.

Figura 9- Expressão relativa dos genes UPS em resposta a tratamento com melatonina 10 μ M em aproximadamente 24h pós-invasão, após 3, 4, 5 e 6 h de. A expressão de cada gene foi normalizada com a do gene 18S ribossomal. Ao menos três experimentos independentes foram realizados para cada ponto de tempo (ver tabela II) e cada um analisado por PCR em tempo real em triplicatas. A análise estatística foi realizada com os valores do $\Delta\Delta CT$ em $\log_2$ pelo teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Tabela II- Análise por PCR em tempo real de genes do UPS após tratamento de *P. falciparum* com melatonina 10 μ M durante 3, 4, 5 e 6 horas. MER, média da expressão relativa em $\log_2$ ($\log_2\Delta\Delta CT$); DP, desvio padrão; N, número de experimentos independentes realizados.

Genes	ID	3h	4h	5h	6h
		MER, DP e N	MER, DP e N	MER, DP e N	MER, DP e N
PF11_0177	Ubiquitina C-terminal hidrolase	0,36 $\pm$ 0,31;3	1,09 $\pm$ 0,13;4	1,48 $\pm$ 0,51;3	0,20 $\pm$ 0,27;4
PFL1790w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	0,45 $\pm$ 0,41;4	1,60 $\pm$ 0,72;4	1,57 $\pm$ 0,45;4	-0,24 $\pm$ 0,25;4
PFL1245w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	0,10 $\pm$ 0,57;3	1,47 $\pm$ 1,13;3	1,88 $\pm$ 0,18;3	0,40 $\pm$ 0,29;4
PFL0190w	E2 enzima conjugadora de ubiquitina	0,14 $\pm$ 0,12;4	0,04 $\pm$ 0,64;4	-0,03 $\pm$ 0,21;3	-0,48 $\pm$ 0,52;4
PFL1565c	Proteína hipotética contendo o domínio F-box	0,55 $\pm$ 0,78;4	0,32 $\pm$ 0,18;3	1,61 $\pm$ 0,28;3	0,20 $\pm$ 0,86;4
PFF0960c	Proteína hipotética contendo o domínio F-box	0,00 $\pm$ 0,10;3	1,45 $\pm$ 0,26;3	1,08 $\pm$ 0,41;3	-0,38 $\pm$ 0,09;3
PFC0845c	Ubiquitina ligase	0,30 $\pm$ 0,07;3	0,56 $\pm$ 0,18;4	0,86 $\pm$ 0,26;3	0,09 $\pm$ 0,12;4
MAL8P1.23	Ubiquitina ligase	0,39 $\pm$ 0,44;3	2,11 $\pm$ 0,93;4	1,71 $\pm$ 0,97;3	-0,55 $\pm$ 0,13;3
MAL13P1.337	Skp1	0,09 $\pm$ 0,43;3	-0,16 $\pm$ 0,62;4	0,13 $\pm$ 0,35;3	-0,32 $\pm$ 0,19;4
PF08_0094	Culina-like	0,16 $\pm$ 0,32;3	-0,01 $\pm$ 0,49;3	2,28 $\pm$ 0,74;3	0,13 $\pm$ 0,55;4
PFF1445c	Culina-like	-0,01 $\pm$ 0,67;3	1,68 $\pm$ 0,99;4	1,12 $\pm$ 0,49;4	-0,34 $\pm$ 0,37;4
PF14_0025	Subunidade do proteossomo, putativo	0,14 $\pm$ 0,19;3	1,91 $\pm$ 0,56;4	0,31 $\pm$ 2,07;3	-0,10 $\pm$ 0,61;4
PFA0400c	Subunidade do proteossomo Beta-3, putativo	0,29 $\pm$ 0,52;3	-0,03 $\pm$ 0,70;4	0,54 $\pm$ 0,49;3	0,07 $\pm$ 0,33;4
PFI1085w	Ubiquitina-like	0,03 $\pm$ 0,52;3	0,57 $\pm$ 0,14;3	0,50 $\pm$ 0,26;3	-0,29 $\pm$ 0,16;4

Embora o trabalho de Hotta et al. 2000 mostre que concentrações de melatonina a partir de 10 nM as concentrações de melatonina no plasma humano estão descritas na faixa picomolar durante a noite, segundo (Kennaway, Voultsios, 1998). Desta forma, analisamos a regulação dos transcritos para o UPS quando tratamos os parasitas com uma concentração de melatonina mais baixa que 10 μ M (100 nM) e portanto, mais próxima da fisiológica, durante 5h de tratamento

(período de tratamento em que foi possível observar um maior número de genes regulado) (Figura 10).

Figura 10- A- Expressão relativa dos genes UPS em resposta a tratamento com melatonina 100 nM em aproximadamente 24h pós invasão, após 5h de tratamento comparada e expressão do gene correspondente em parasitas tratados apenas com o solvente (etanol 0,00005%). B- Expressão relativa dos genes UPS em resposta a melatonina 100 nM em aproximadamente 24h pós invasão, após 5h de tratamento na presença de luzindole 250 μ M. A expressão de cada gene foi normalizada com a do gene 18S ribossomal. Ao menos três experimentos independentes foram realizados (ver tabela III) e cada um analisado por PCR em tempo real em triplicatas. A análise estatística foi realizada com COM os valores do $\Delta\Delta CT$ em $\log_2$ pelo teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Interessantemente, quando os parasitas são tratados com 100 nM de melatonina, um número maior de genes é regulado positivamente quando comparado ao tratamento com a concentração de 10 μ M de melatonina. Em adição aos genes modulados com 10 μ M de melatonina, os genes PFL0190w (E2 enzima conjugadora de ubiquitina) PFF1445c (Culina-like), PF14_0025 (Subunidade do proteossomo) e PFI1085w (Ubiquitina-like) são regulados positivamente após tratamento de melatonina na concentração de 100 nM.

Para avaliarmos se a regulação da transcrição dos genes do UPS era decorrente de um aumento geral na transcrição dos genes, uma vez que 11 dos 14 genes analisados foram regulados positivamente, utilizamos três genes que não fazem parte do UPS. São eles: diacilglicerol quinase (PFI1485c), transportador de nucleotídeo 1 (PF13_0252) e DNA helicase (MAL13P1.216) (**Figura 10 e Tabela I**).

Avaliamos então se a inibição promovida pelo antagonista de receptor de melatonina, luzindole, na modulação do ciclo (Hotta, Gazarini et al., 2000), influenciaria na modulação dos transcritos do UPS, reforçando a ideia de que a modulação do UPS está envolvida na modulação do ciclo intraeritrocítico por melatonina via receptor de membrana. Para isso, tratamos os parasitas com melatonina na presença de luzindole e avaliamos os níveis de transcritos do UPS por PCR em tempo real (**Figura 10B**).

Tabela III- Análise por PCR em tempo real de genes do UPS após tratamento de *P. falciparum* com melatonina 100 nM e na presença de luzindole 250 μ M durante 5 horas. MER, média da expressão relativa ($\log_2\Delta\Delta CT$); DP, desvio padrão; N, número de experimentos independentes realizados.

Genes	ID	Melatonin 100 nM	Melatonina 100nM + Luzindole 250 μ M
		MER, DP e N	MRE, SD and N
PF11_0177	Ubiquitina C-terminal hidrolase	1,83 $\pm$ 0,73;8	0,56 $\pm$ 0,71;5
PFL1790w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	1,66 $\pm$ 1,00;7	0,04 $\pm$ 1,02;5
PFL1245w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	1,84 $\pm$ 1,08;7	0,66 $\pm$ 1,03;5
PFL0190w	E2 enzima conjugadora de ubiquitina	1,73 $\pm$ 0,58;5	-0,62 $\pm$ 0,56;5
PFL1565c	Proteína hipotética contendo o domínio F-box	1,55 $\pm$ 0,86;8	0,98 $\pm$ 1,15;4
PFF0960c	Proteína hipotética contendo o domínio F-box	0,80 $\pm$ 0,36;6	-0,15 $\pm$ 0,34;4
PFC0845c	Ubiquitina ligase	1,40 $\pm$ 1,03;6	0,13 $\pm$ 0,08;4
MAL8P1.23	Ubiquitina ligase	2,00 $\pm$ 1,38;7	-0,15 $\pm$ 0,74;5
MAL13P1.337	Skp1	0,83 $\pm$ 0,53;7	-0,50 $\pm$ 0,42;4
PF08_0094	Culina-like	2,48 $\pm$ 1,38;7	0,45 $\pm$ 1,06;5
PFF1445c	Culina-like	2,01 $\pm$ 1,37;7	-0,31 $\pm$ 0,75;5
PF14_0025	Subunidade do proteossomo, putativo	1,76 $\pm$ 0,88;8	1,11 $\pm$ 1,11;5
PFA0400c	Subunidade do proteossomo Beta-3, putativo	1,09 $\pm$ 0,75;7	0,78 $\pm$ 1,03;5
PFI1085w	Ubiquitina-like	1,77 $\pm$ 1,29;5	-0,08 $\pm$ 0,74;5
PFI1485c	Diacylglicerol quinase	0,98 $\pm$ 0,97;4	0,13 $\pm$ 0,698;4
PF13_0252	Transportador de nucleosídeo 1	0,89 $\pm$ 0,71;4	1,14 $\pm$ 0,739;4
MAL13P1.216	DNA helicase	0,80 $\pm$ 0,85;3	1,48 $\pm$ 0,661;4

Considerando-se apenas a regulação dos níveis de transcritos que resultassem em um aumento ou diminuição maior que duas vezes, podemos afirmar que o tratamento com luzindole

inibe a ação da melatonina em *P. falciparum* impedindo a modulação dos níveis de transcritos do UPS.

4.1.1 Modulação dos genes do UPS em resposta a N-acetil serotonina

Uma vez que outros derivados de triptofano como N-acetil serotonina, triptamina e serotonina também são capazes de modular o ciclo de *P. falciparum* (Beraldo, Garcia, 2005), avaliamos a possibilidade de outros derivados de triptofano, além da melatonina, modular os níveis de transcritos do UPS. Para esta finalidade, tratamos os parasitas com N-acetil serotonina (NAS) 100 nM nas mesmas condições em que os parasitas foram tratados com melatonina e analisamos os mesmos quatorze genes do UPS por PCR em tempo real.

Figura 11- Expressão relativa dos genes UPS em resposta a tratamento com N-acetilserotonina 100 nM em aproximadamente 24h pós invasão, durante 5h de tratamento comparada e expressão do gene correspondente em parasitas tratados apenas com o solvente (etanol 0,00005%). A expressão de cada gene foi normalizada com a do gene 18S ribossomal. Ao menos três experimentos independentes foram realizados (ver tabela IV) e cada um analisado por PCR em tempo real em triplicatas. A análise estatística foi realizada com os valores do $\Delta\Delta CT$ em $\log_2$ pelo teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A **figura 11** e **tabela IV** mostram que a adição de N-acetil serotonina também é capaz de modular a expressão de alguns dos genes do UPS analisados, porém, diferentemente ao tratamento com melatonina 100 nM, os genes PFL0190w (E2 enzima conjugadora de ubiquitina), PFC0845c (Ubiquitina ligase), MAL8P1.23 (Ubiquitina ligase), PFF1445c e PF08_0094 (Culina-like) não sofreram alteração nos níveis de transcritos.

Tabela IV- Análise por PCR em tempo real de genes do UPS após tratamento de *P. falciparum* com N-acetilserotonina durante 5 horas. MER, média da expressão relativa ($\log_2\Delta\Delta CT$); DP, desvio padrão; N, número de experimentos independentes realizados.

Genes	ID	N- acetilserotonina
		MER, DP e N
PF11_0177	Ubiquitina C-terminal hidrolase	1,23±0,70;4
PFL1790w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	1,34±0,47;4
PFL1245w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	2,02±0,50;3
PFL0190w	E2 enzima conjugadora de ubiquitina	0,67±0,32;4
PFL1565c	Proteína hipotética contendo o domínio F-box	1,55±0,87;4
PFF0960c	Proteína hipotética contendo o domínio F-box	0,60±0,99;4
PFC0845c	Ubiquitina ligase	0,82±0,48;5
MAL8P1.23	Ubiquitina ligase	1,08±0,78;3
MAL13P1.337	Skp1	0,87±0,20;3
PF08_0094	Culina-like	1,32±0,83;3
PFF1445c	Culina-like	0,78±0,54;4
PF14_0025	Subunidade do proteossomo, putativo	1,67±0,22;3
PFA0400c	Subunidade do proteossomo Beta-3, putativo	1,27±0,28;3
PFI1085w	Ubiquitina-like	1,07±0,86;5

Desta forma podemos sugerir que os genes modulados por ambos os compostos (melatonina e N-acetil serotonina) poderiam ser os alvos para a modulação do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*.

Visto que a melatonina é uma molécula pleiotrópica, sua ação no parasita pode não se restringir em modular o ciclo intraeritrocítico, ou ainda que este efeito pode ser alcançado por diferentes vias.

4.1.2 Parasitas *pfpk7* são irresponsivos à melatonina quanto à modulação do UPS

A ausência do gene *pfpk7* em *P. falciparum* leva a um crescimento lento durante o ciclo intraeritrocítico e faz com que os esquizontes produzam um número de merozoítos inferior ao parental (Dorin-Semblat, Sicard et al., 2008). Além disto, parasitas nocautes para o gene *pfpk7*, são incapazes de responder a melatonina no que concerne à modulação do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* (levando a um aumento da população de esquizontes e diminuição das fases jovens). Contudo, parasitas em que a expressão da PK7 é complementada, a ação da melatonina é consequentemente restaurada (Koyama, Ribeiro et al., 2012).

De forma análoga, testamos a possibilidade desta quinase estar envolvida na regulação dos genes do UPS em resposta a melatonina. Para isto, realizamos experimentos de PCR em tempo real seguindo o mesmo protocolo citado anteriormente para tratamento com melatonina 100 nM onde a única exceção é que os níveis de transcritos foram analisados em parasitas nocautes para o gene *pfpk7* e complementados.

Figura 12- Análise da expressão relativa por PCR em tempo real de genes do UPS em resposta a tratamento com melatonina, em 24 h pós-invasão, em A- parasitas nocaute para o gene da *pfpk7* e B- parasitas complemento para a Pfk7 após 5h de tratamento com melatonina 100 nM comparados a expressão do gene correspondente em parasitas tratados apenas com o solvente (etanol 0,00005%). A expressão de cada gene foi normalizada com a do gene 18S ribossomal. Ao menos três experimentos independentes foram realizados (ver tabela V) e cada um analisado por PCR em tempo real em triplicatas. A análise estatística foi realizada com os valores do $\Delta\Delta CT$ em $\log_2$ pelo teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A

B

Tabela V- Genes analisados por PCR em tempo real após tratamento com melatonina 100 nM durante 5 horas em parasitas *pfpk7* e Pfpk7 complemento. MER, média da expressão relativa ($\log_2\Delta\Delta CT$); DP, desvio padrão; N, número de experimentos independentes realizados.

Genes	ID	<i>pfpk7</i>	Pfpk7 complemento
		MER, DP e N	MER, DP e N
Pf11_0177	Ubiquitina C-terminal hidrolase	0,65±0,03;4	1.79± 0,63;5
PfL1790w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	0,71±0,02;3	1.18± 0.63;5
PfL1245w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	0,74±0,21;4	1.64± 0.61;5
PfL0190w	E2 enzima conjugadora de ubiquitina	0,22±0,28;4	0.92± 0.36;5
PfL1565c	Proteína hipotética contendo o domínio F-box	0,72±0,48;4	2.03± 0.93;5
PfF0960c	Proteína hipotética contendo o domínio F-box	0,32±0,09;4	0.66± 0.27;3
PfC0845c	Ubiquitina ligase	0,09±0,34;4	0.49± 0.29;5
MAL8P1.23	Ubiquitina ligase	0,56±0,33;3	1.76± 1.56;4
MAL13P1.337	Skp1	0,01±0,13;4	0.47± 0.86;4
Pf08_0094	Culina-like	0,57±0,13;4	1.57± 1.27;4
PfF1445c	Culina-like	0,73±0,65;4	0.91± 1.62;3
Pf14_0025	Subunidade do proteossomo, putativo	0,65±0,23;3	2.00± 0.97;5
PfA0400c	Subunidade do proteossomo Beta-3, putativo	0,53±0,31;3	0.70± 0.4;4;4;4
PfI1085w	Ubiquitina-like	0,47±0,09;3	1.56± 0.97;4
PfI1485c	Diacilglicerol quinase	0,66±0,61;3	0.82± 0.49;3
Pf13_0252	Transportador de nucleosídeo 1	0,74±0,49;3	0.62± 1,12;4
MAL13P1.216	DNA helicase	0,75±0,22;3	0.48± 0.63;3

A **figura 12A** e **tabela V** claramente mostram que na ausência da proteína kinase 7 o parasita não mais é capaz de modular os níveis de transcritos dos genes do sistema ubiquitina/proteossomo como no parasita selvagem. Entretanto, com a complementação da PK7

(**Figura 12B**) podemos observar que o efeito causado pela melatonina na modulação dos genes do UPS foi parcialmente reposto. Os genes: PF11_0177 (Ubiquitina C-terminal hidrolase), PFL1790w e PFL1245w (E1 enzima ativadora de ubiquitina), PFL0190w (E2 enzima conjugadora de ubiquitina), PFL1565c (Proteína hipotética contendo o domínio F-box), PF14_0025 (Subunidade do proteossomo) e PFI1085w (Ubiquitina-like) foram regulados positivamente quando a PK7 é complementada ao parasita nocaute.

Por este motivo, acreditamos que a proteína quinase 7 desempenhe papel crucial na regulação dos níveis de transcritos para alguns dos genes do UPS em resposta a melatonina.

O fato de a modulação da abundância de transcritos dos genes do UPS ocorrer de forma diferenciada em resposta a melatonina entre parasitas *wild type* e complementados, pode ser explicada uma vez que a complementação da proteína PK7 se dá na expressão a partir de um episssomo, o que leva a uma expressão diferencial da endógena. A complementação se dá pela expressão da região codificante para o gene da *pfpk7* sob controle do promotor constitutivo Hsp86 do vetor pHCD (Tonkin, van Dooren et al., 2004). A expressão endógena da PfPK7 entretanto ocorre apenas durante os estágios maduros do ciclo intraeritrocítico (Otto, Wilinski et al., 2010) o que pode explicar a reposição parcial do fenótipo.

Comparando-se os genes com aumento da abundância de transcritos induzidos tanto pela melatonina quanto por NAS e pela melatonina em parasitas complementados para a PK7 podemos verificar que cinco genes foram modulados em todas as condições aqui testadas. São eles: PF11_0177 (Ubiquitina C-terminal hidrolase), PFL1790w (E1 enzima ativadora de ubiquitina), PFL1565c (Proteína hipotética contendo o domínio F-box), PFL1245w (E1 enzima ativadora de ubiquitina) e PF14_0025 (Subunidade do proteossomo, putativo) genes esses que com exceção do

PFL1565c (Proteína hipotética contendo o domínio F-box) estão todos envolvidos no processo geral de ubiquitinação e degradação de proteínas pelo proteossomo (**Tabela VI**).

Tabela VI- Resumo dos genes analisados e correspondente modulação nas diversas condições em *P. falciparum*. Denominamos “sim” para o gene analisado que sofreu regulação positiva ou “não” para os que não sofreram regulação positiva.

Genes Nº acesso Plasmoddb	Melatonina				NAS 100 nM 5h
	10 µM 4h	10 µM 5h	100 nM 5h	PK7 complemento 100 nM 5h	
PF11_0177	sim	sim	sim	sim	sim
PFL1790w	sim	sim	sim	sim	sim
PFL1245w	não	sim	sim	sim	sim
PFL0190w	não	não	sim	sim	não
PFL1565c	não	sim	sim	sim	sim
PFF0960c	sim	sim	não	não	não
PFC0845c	não	não	sim	não	não
MAL8P1.23	sim	sim	sim	não	não
MAL13P1.337	não	não	não	não	não
PF08_0094	não	sim	sim	não	não
PFF1445c	sim	não	sim	não	sim
PF14_0025	sim	não	sim	sim	sim
PFA0400c	não	não	sim	não	não
PFI1085w	não	não	sim	sim	não

4.1.3 Perfil de ubiquitinação de proteínas em resposta à melatonina

A questão que surge então é como o parasita transduz o sinal da melatonina através da ubiquitinação de proteínas. O aumento dos níveis de transcritos dos genes do UPS pode indicar um aumento da expressão dos genes e consequentemente aumentar a ubiquitinação de proteínas. Por outro lado, o acúmulo de RNA mensageiro dos genes pode indicar alteração da estabilidade do

RNA mensageiro, o que levaria a uma diminuição de proteínas e consequentemente do processo de ubiquitinação de proteínas.

Buscamos assim avaliar o perfil de ubiquitinação de proteínas de parasitas tratados ou não com melatonina. Para este propósito, realizamos experimentos de imunoblot utilizando anticorpos para a ubiquitina. Assim, parasitas em sua maioria presente no estágio esquizonte, foram em parte tratados com melatonina 100 nM e em parte tratados apenas com o solvente (etanol 0,00005%) durante 6 h. Os extratos protéicos, resultantes desses tratamentos, foram utilizados nas análises por imunoblot.

Podemos observar na **figura 13** que após o tratamento com melatonina, não ocorre um aumento ou diminuição geral de ubiquitinação das proteínas, mas podemos ver eventos de ubiquitinação de forma diferencial, como observado na banda de aproximadamente 50 kDa apenas nas amostras tratadas com 10 μ M de melatonina.

Para identificar as proteínas diferencialmente ubiquitinadas, repetimos os tratamentos nas mesmas condições e imunoprecipitamos as proteínas ubiquitinadas utilizando anticorpos para a ubiquina. As proteínas contidas na banda diferencial foram analisadas através de espectrometria de massa (realizada na Tufts University). Sete proteínas foram identificadas presentes na banda diferencial. A proteína L4/L1 subunidade 60S ribossomal, proteína ribossomal L3, o fator de elongação eIF4 α -like, actina, cadeia beta da tubulina, a chaperona DNAJ, S-adenosilmetionina sintetase (**Tabela VII**).

Figura 13- Perfil de ubiquitinação de proteínas em *P. falciparum* tratado em estágio trofozoíta com melatonina 10 μ M por 6h. A- *Western blot* com anti-ubiquitina, controle de loading, anti- β tubulina. B- Imunoprecipitação com anti-ubiquitina. * banda analisada por espectrometria de massa.

Um dos efeitos mais bem caracterizados da melatonina em células de mamíferos é o rearranjo de citoesqueleto (Benitez-King, 2006). Entretanto ainda não é sabido se a melatonina é capaz de induzir a ubiquitinação dos componentes de citoesqueleto.

Embora a ubiquitinação da actina de *Plasmodium* tenha sido reportada, sendo encontrada em merozoítos, o mesmo grupo, afirmou tempo depois, que o evento observado anteriormente não era reprodutível (Field, Pinder et al., 1993, Schmitz, Grainger et al., 2005).

Tabela VII- Proteínas diferencialmente imunoprecipitadas, utilizando-se anticorpos para ubiquitina, identificadas por espectrometria de massa.

Nº acesso Plasmodb	ID	GO	Massa molecular predita kDa
PFE0350c	Subunidade ribossomal 60S proteína L4/L1		46,2 kDa
PF10_0272	Proteína ribossomal L3	Tradução	44,2 kDa
PFD1070w	eIF4A-like		44,8 kDa
PFI1090w	S-adenosilmetionina sintetase		44,8 kDa
PF14_0700	Heat shock protein 40	Organização de citoesqueleto	52,4 kDa
PF10_0084	β -tubulina		49,7 kDa
PFL2215w	actina I		41,8 kDa

Para verificarmos se a actina seria alvo de ubiquitinação em resposta a melatonina realizamos experimentos de imunoprecipitação cruzada utilizando anticorpos tanto para a actina quanto para a ubiquitina (**Figura 14**). Porém, através dos experimentos realizados não podemos concluir que a ubiquitinação de actina ocorra, nem mesmo que a melatonina esteja induzindo esta modificação, uma vez que não há diferença significativa entre as amostras controle e tratado. Além disso, a baixa eficiência de liberação do anticorpo com glicina ácida leva a eluição das cadeias leve e pesada, esta última que tem peso molecular muito similar ao encontrado na banda diferencial (aproximadamente 50 kDa). Ainda, podemos observar uma banda presente com

aproximadamente 50 kDa que aparece tanto nas amostras precipitadas com anticorpos ou nas controles (ausentes de anticorpos).

Figura 14- *Western blots* (WB) de proteínas imunoprecipitadas (IP) com anticorpo para ubiquitina ou actina provenientes de parasitas tratados ou não com melatonina. Na ausência de anticorpos utilizados para imunoprecipitação pode-se observar proteínas ligadas inespecificamente as proteínas A/G sefarose.

De acordo com o trabalho publicado por (Le Roch, Johnson et al., 2004), a expressão da beta tubulina varia durante o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* (**Figura 15A**) estando presente em maior quantidade no estágio de esquizonte com baixa representatividade durante os estágios de anel e trofozoíto.

Através de ensaios de imunofluorescência indireta confirmamos os dados de proteômica reportado (Le Roch, Johnson et al., 2004), onde podemos observar a presença de beta tubulina apenas em esquizontes e merozoítos (**Figura 15B**).

Figura 15- Expressão da beta tubulina durante os estágios intraeritrocíticos de *P. falciparum*. A- Dados de estudo de proteômica. Modificado de Le Roch, Johnson et al. 2004. B- Imunofluorescência indireta utilizando anticorpos para a beta tubulina em diluição 1:100 e anti IgG conjugado a Alexa 546 em diluição 1:300. O DAPI foi utilizado para marcação de DNA e assim permitir a visualização do(s) núcleo(s).

Avaliamos uma possível ubiquitinação da tubulina em resposta a melatonina. O evento seria identificado caso aparecesse uma banda de maior peso molecular no experimento de imunoblot para a tubulina. Embora não tenhamos visto a banda que indicasse ubiquitinação, observamos uma quantidade maior de beta tubulina em parasitas em estágio de desenvolvimento aproximadamente 38 h pós-invasão (esquizonte) após 14 h de tratamento com melatonina (considerando que o tratamento de melatonina era sempre realizado em 24 h pós-invasão) quando comparada ao controle (parasitas tratados apenas com o solvente) (**Figura 16A**).

Coincidentemente, o ponto de tempo 38 h em que podemos observar uma quantidade de beta tubulina maior na amostra tratada com o hormônio comparada ao controle, também observamos um maior número de esquizontes na população de parasitas tratados com melatonina neste mesmo ponto de tempo, (71 %) em relação ao controle, (48 %) e uma menor população de anéis entre os parasitas tratados com melatonina (24,8 %) em relação ao controle (40,5 %). Levando em conta que a expressão de beta tubulina é maior em esquizontes comparado aos anéis, o conteúdo de beta tubulina diferencial entre as amostras tratadas com melatonina em relação ao controle em 38 h pós-invasão ilustra a modulação do ciclo intraeritrocítico causada pela melatonina.

Recentemente foi publicada a identificação de proteínas ubiquitinadas em *P. falciparum* por imunoprecipitação e análise por espectrometria de massa (Ponts, Saraf et al., 2011). Neste trabalho, os autores observaram a presença tanto de actina como de beta tubulina em amostras em que os anticorpos para a ubiquitina não haviam sido adicionados, demonstrando a inespecificidade de imunoprecipitação destas proteínas (Ponts, Saraf et al., 2011).

Figura 16- A- Análise da expressão de beta tubulina durante 34 a 39 h pós invasão após 10-15 h de tratamento com melatonina 100 nM comparados ao controle (parasitas tratados apenas com o solvente etanol 0,00005 %) por imunoblot utilizando anticorpos específicos para a beta tubulina. Abaixo, controle de *loading* com membrana utilizada no experimento de imunoblot corada com *coomassie blue*. B- Densitometria das bandas normalizadas pelo respectivo *controle de loading* e subsequentemente pelo controle negativo. C- Contagem dos estágios intraeritrocíticos presentes em cada amostra analisada por imunoblot. Foram realizados três experiemntos independentes sendo um deles representado aqui.

Assim, decidimos buscar novos alvos e, como para o PCR em tempo real, avaliamos o perfil de ubiquitinação em trofozoítos tratados com uma concentração de melatonina mais próxima á fisiológica (100 nM) em quatro pontos de tempo (6, 7,8 e 9 h de tratamento).

Figura 17- Perfil de ubiquitinação de proteínas provenientes de parasitas tratados (+) ou não (-) com melatonina 100 nM. A- *Western blot* utilizando anticorpos para ubiquitina. Abaixo, a membrana corada com *coomassie blue* apresentada como controle de *loading*. B- densitometria de bandas analisadas pelo software Image Lab (BioRad). O eixo x corresponde à numeração das bandas em A com o respectivo ponto de tempo.

A

B

Podemos observar na **figura 17** que um perfil diferencial de ubiquitinação ocorre em resposta à melatonina, e que esta modulação aparentemente é temporal. Durante 6 e 7 h de tratamento, as bandas diferenciais estão preferencialmente menos ubiquitinadas nas amostras em que a melatonina foi adicionada, comparado ao controle. Já em 8 e 9 h de tratamento, as bandas diferenciais estão preferencialmente mais ubiquitinadas em relação ao controle. A possibilidade de observarmos essas diferenças devido à adição de concentrações diferentes de proteína é descartada, uma vez que o controle de *loading*, em que a membrana utilizada no experimento de *Western blot* foi corada com *coomassie blue* apresenta quantidades similares de proteína em todas as amostras e, ainda, podemos observar diversas bandas contendo proteínas que não sofreram alterações no perfil de ubiquitinação entre as amostras comparadas.

Através de experimentos de *Western blot*, entretanto, não é possível identificar os alvos de ubiquitinação em resposta à melatonina. Assim, realizamos novamente experimentos de imunoprecipitação a partir de 9 h de tratamento com melatonina, utilizando anticorpos para a ubiquitina na tentativa de identificar os substratos diferencialmente ubiquitinados em resposta à melatonina (**Figura 18**). Na **figura 18A** podemos observar duas bandas (1 e 2) contendo maior quantidade de proteínas na amostra tratada com melatonina em comparação ao controle.

Em adição, parte do extrato de proteínas utilizado na imunoprecipitação foi analisado por imunoblot e o controle de *loading* foi verificado corando-se a membrana com *coomassie blue*.

Figura 18- Imunoprecipitação de proteínas ubiquitinadas. A- Proteínas imunoprecipitadas coradas com *coomassie blue*. B- *Western blot* do extrato total com anticorpo para ubiquitina. C- Membrana contendo extrato total corada com *coomassie blue*. D- Densitometria das bandas 1 e 2. E- Quantificação das proteínas identificadas por espectrometria de massa da banda 2. Os valores no eixo Y se referem à contagem dos espectros normalizados por albumina, analisados pelo programa Scaffold 3.

Através de análise por espectrometria de massa nenhuma proteína pode ser identificada na banda 1 imunoprecipitada, enquanto que na banda 2 foram identificadas a actina e a fosfoglicerato quinase. Porém, através da quantificação informada pela análise por espectrometria de massa, concluímos que nem a fosfoglicerato quinase tampouco a actina estão presentes em maior

quantidade nas amostras provenientes de parasitas tratados com melatonina. Desta forma, através das análises apresentadas, embora tenhamos visto uma modulação na ubiquitinação de algumas proteínas, não foi possível identificar possíveis alvo(s) de ubiquitinação em resposta a melatonina.

Verificamos então se a capacidade do luzindole em inibir a atividade da melatonina na modulação do ciclo intraeritrocítico e a modulação dos níveis de transcritos do UPS também ocorreria no perfil de ubiquitinação de proteínas. Para isso, realizamos experimentos de *Western blot* de extratos protéicos provenientes de tratamentos de *P. falciparum* com melatonina (100 nM) na presença ou ausência de luzindole (250 μ M).

Como observado na **figura 19**, após tratamento com melatonina é possível notar algumas proteínas diferencialmente ubiquitinadas que ocorrem de forma menos pronunciada nas amostras de parasitas tratados com o hormônio na presença de luzindole. Curiosamente, após 9 h de tratamento, as mesmas bandas aparecem tanto no controle quando no tratado com melatonina e ausentes nas amostras tratadas com luzindole.

A **figura 19** ilustra apenas um dos três experimentos realizados, e estes, embora apresentem também um perfil diferencial de ubiquitinação, as bandas identificadas contendo os possíveis alvos de ubiquitinação em resposta a melatonina são distintos nos experimentos independentes (dados não mostrados). Porém, em todos eles, a modificação que ocorre em resposta a melatonina não é observada quando há o pré tratamento com luzindole, evidenciando a provável dinâmica do processo de ubiquitinação.

Figura 19- A- Perfil de ubiquitinação de proteínas avaliado através de *Western blot* utilizando anticorpos para a ubiquitina de parasitas tratados com melatonina (100 nM) comparados com os parasitas tratados com melatonina (100 nM) na presença de luzindole (250 μ M). Abaixo, membrana corada com *coomassie blue* utilizada como controle de *loading*. A seta indica onde as proteínas diferencialmente ubiquitinadas se encontram. B- Densitometria das bandas de interesse em 7h de tratamento normalizadas pelo *coomassie blue* e analisadas pelo programa Image J.

Através destes dados, então, podemos propor que a ação da melatonina na modulação do UPS é inibida por luzindole e reforçando a ideia de que a via de sinalização de melatonina em *P. falciparum* ocorra através de um receptor sensível a este antagonista.

4.2 Fosforilação de proteínas pela PKA em resposta à melatonina

Em colaboração com o Prof. Dr. Debopam Chakrabarti da *University of Central Florida*, EUA, buscamos estender o estudo da via de sinalização de melatonina em *P. falciparum* através a participação de eventos de fosforilação, uma vez que nosso grupo demonstrou a participação de pelo menos três proteínas quinases nesta via, a PK7, a PKA e a PfeIK1 (Beraldo, Almeida et al., 2005, Ribeiro, 2010).

Como citado anteriormente, nosso grupo verificou que a proteína quinase A (PKA) participa da via de sinalização de melatonina uma vez que após adição da indolamida a atividade da PKA aumenta em relação a atividade da proteína quinase não estimulada levando a um aumento da concentração citossólica de cálcio (Beraldo, Almeida et al., 2005, Gazarini, Beraldo et al., 2011). É possível, entretanto que a ativação da PKA tenha como alvo outros substratos senão aqueles que levam a um aumento da concentração de cálcio citossólico.

Desta forma avaliamos o perfil de fosforilação de substratos de PKA em resposta à melatonina por experimentos de *Western blot* utilizando-se anticorpos que reconhecem substratos fosforilados pela PKA. Este anticorpo detecta peptídeos e proteínas contendo um resíduo de serina/treonina fosforilada com uma arginina na posição -3. Embora este anticorpo possua atividade cruzada com substratos de PKC, não esperamos observar tal reação cruzada uma vez que a proteína quinase C (PKC) não foi identificada em *Plasmodium falciparum*.

Assim, ao meio de cultura de *P. falciparum* foi adicionado melatonina 100 nM ou solvente (etanol 0,00005%) utilizado como controle negativo, e as amostras foram coletadas após 5, 30 e 60 minutos de tratamento.

Figura 20- Perfil de fosforilação de substratos de PKA em parasitas tratados (+) ou não (-) com melatonina 100 nM em 5, 30 e 60 minutos após o tratamento. A- Western blot utilizando anticorpos para substratos de PKA fosforilados. B- Densitometria das bandas 1, 2 e 3 diferencialmente fosforiladas utilizando o programa Image Lab (BioRad).

Como podemos observar na **figura 20**, após 5 minutos de tratamento pelo menos 3 bandas analisadas apresentam um perfil de fosforilação diferenciada entre parasitas tratados ou não com melatonina 100 nM. Na tentativa de identificar as proteínas que poderiam estar sendo diferencialmente fosforiladas na presença de melatonina, realizamos experimentos de imunoprecipitação utilizando os mesmos anticorpos para substratos de PKA (Cell Signaling). Entretanto, a quantidade de proteína eluída foi muito baixa (abaixo de 10 ng), o que indica uma ineficiência no processo quando utilizamos o anticorpo citado. Portanto, embora tenhamos indícios de eventos de fosforilação de proteínas pela proteína quinase A, em resposta à melatonina, ainda não foi possível identificar os substratos diferencialmente fosforilados.

4.3 Análise da responsividade de parasitas da malária ao ácido indol-3-acético (AIA)

4.3.1 Avaliação da distribuição dos estágios intraeritrocíticos após tratamento com AIA

Avaliamos a capacidade do parasita em responder ao ácido indol-3-acético (AIA), também derivado de triptofano, e que possui estrutura similar a melatonina (ver **figura 4**) uma vez que diversos compostos derivados de triptofano são capazes de modular o ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium* (Hotta, Gazarini et al., 2000, Beraldo, Garcia, 2005),

Usando a metodologia de citometria de fluxo, através da marcação do DNA com o intercalante YOYO-1 (Li, Gerena et al., 2007) podemos claramente separar fases jovens e maduras de *P. falciparum*. Já foi descrito para diferentes fluorocromos que a intensidade de fluorescência de marcadores de DNA em parasitas no estágio esquizonte em média 10 vezes maior que a encontrada em anel (Janse, van Vianen et al., 1987).

Para demarcação dos *gates* dos estágios intraeritrocíticos dos parasitas, foram utilizadas as culturas sincronizadas nos estágios de anel e esquizontes, além dos eritrócitos não infectados. Baseados no perfil de distribuição da população nos histogramas a partir da marcação de DNA, podemos observar a flutuação da população de acordo com o aumento de fluorescência em uma população com maior número de esquizontes (Schuck, Ribeiro et al., 2011).

Figura 21- Perfil de distribuição da população de parasitas a partir da marcação de DNA com YOYO-1. A fluorescência é captada pelo filtro FL1-H. A população mononucleada representa os parasitas nos estágios de anéis e trofozoítos. A população de multinucleados representa os parasitas que se encontram no estágio de esquizonte do ciclo intraeritrocítico. A parasitemia é a soma das duas populações.

Fonte : Modificado de Schuck et al 2011.

Assim, avaliamos a distribuição dos estágios do ciclo intraeritrocítico após 24 h de tratamento com melatonina, ácido indol-3-acético ou ambos em 0,1, 1 e 10 μ M comparados ao controle, em que foi adicionado apenas o solvente (etanol, 0,00005%, 0,0005% e 0,005%).

Figura 22- Histogramas representativos dos experimentos de citometria de fluxo analisados após 24 h de tratamento com A- melatonina ou AIA e B- melatonina ou ambos AIA e melatonina. Em vermelho controle, em azul parasitas tratados com com melatonina, e em verde, parasitas tratados AIA (A) ou tratados com AIA conjuntamente com melatonina (B). A demarcação dos *gates* foi realizada utilizando parasitas sincrônicos em anel e esquizonte durante a análise de cada experimento.

A **figura 22** ilustra o perfil da distribuição dos estágios intraeritrocíticos após o tratamento com melatonina, AIA ou ambos. Para que a modulação do ciclo fosse analisada de forma estatística, um número de experimentos maior que 3 vezes foi realizado.

Os dados da **figura 23** apresentam as médias dos valores das proporções de cada estágio normalizados em relação ao respectivo controle (100 %).

Figura 23- Distribuição dos estágios intraeritrocíticos de *P. falciparum* em tratamento com ácido indol-3-acético (AIA) e melatonina (Mel). A – Comparação entre tratamentos com melatonina (Mel) e ácido indol-3-acético (AIA) separadamente. B - Comparação entre tratamentos com melatonina e ácido indol-3-acético conjuntamente. Análise estatística com ANOVA e pós teste de Newman Keuls, $p < 0,05$.

De acordo com nossos dados, podemos observar que o ácido indol-3-acético não é capaz de modular o ciclo intraeritrocítico da mesma forma que a melatonina e outros derivados de triptofano (**Figura 23A**). O tratamento com melatonina leva a um aumento no número de esquizontes que varia de 150 a 200 % números esses que são comparáveis aos observados por

Hotta 2000, enquanto que o tratamento com AIA, nas três concentrações testadas, as proporções de esquizontes não são estatisticamente diferentes do controle.

Além disso, o tratamento com ácido indol-3-acético não altera a capacidade da melatonina em modular o ciclo do parasita (**Figura 23B**). Mesmo com o tratamento prévio com AIA não é capaz de impedir que a melatonina induza um aumento de pelo menos 200% em média do número de esquizontes em todas as concentrações testadas (0,1, 1 e 10 μ M).

A parasitemia também foi avaliada após tratamento com o ácido indol-3-acético nas diferentes concentrações (0,1, 1 e 10 μ M) de parasitas assíncronos. Os tratamentos realizados entretanto, não provocaram uma mudança na parasitemia após 24 h em relação aos controles (**Figura 24**) indicando que a não modulação do ciclo não é resultante de um possível efeito tóxico do composto.

Figura 24- Parasitemia após tratamento de *P. falciparum* com melatonina (Mel), ácido indol-3-acético (AIA) ou ambos normalizados pelo controle.

Através destes dados podemos concluir que diferentemente ao tratamento com outros derivados de triptofano como serotonina, triptamina, N-acetil serotonina e melatonina, o ácido indol-3-acético não é capaz de modular do ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* como ocorre em resposta a outros derivados de triptofano citados anteriormente. Entretanto, a não responsividade não está relacionada a um possível efeito tóxico causado pela adição de AIA, visto que a parasitemia permanece inalterada após 24h de tratamento com o composto mesmo nas concentrações mais altas testadas (10 μ M). Ressalta-se que tratamento por 48 horas com melatonina leva a um aumento da parasitemia (Beraldo, Garcia, 2005).

4.3.2 Modulação dos genes do UPS em resposta ao AIA

Na tentativa de caracterizar o AIA como um controle negativo a ação da melatonina avaliamos a modulação dos genes do UPS por PCR em tempo real, como realizado em adição de melatonina ao meio de cultura.

Quando os parasitas são tratados com AIA, entretanto, nenhum dos genes do UPS aqui analisados sofre aumento dos níveis de transcritos, como ocorre quando são tratados com melatonina, mas por outro lado, ocorre uma diminuição da abundância de transcritos do gene PF08_0094 (Culina-like) após o tratamento (**Figura 25**). Este efeito indica que o parasita possa perceber o AIA, mas que nenhuma condição testada se assemelha a observada em resposta a melatonina.

Figura 25- Expressão relativa dos genes UPS em resposta a tratamento com ácido indole-3-acético 100 nM em aproximadamente 24 h pós invasão, durante 5h comparados a expressão do gene correspondente em parasitas tratados apenas com o solvente. A expressão de cada gene foi normalizada com a do gene 18S ribossomal. Ao menos três experimentos independentes foram realizados (ver tabela VII) e cada um analisado por PCR em tempo real em triplicatas. A análise estatística foi realizada com teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Avaliamos então se o perfil de ubiquitinação de proteínas provenientes de parasitas tratados com AIA (100 nM) seria diferente daqueles tratados com melatonina (100 nM) ou apenas com o solvente (etanol 0,00005%) buscando mais uma vez comparar os efeitos causados em parasitas tratados com os referidos compostos. Para isso, realizamos experimentos de *Western blot* utilizando anticorpos para ubiquitina (como citado anteriormente em parasitas tratados com melatonina) em extratos protéicos de parasitas tratados com AIA (100 nM) por 6 h ou apenas com o solvente (**Figura 26 e tabela VIII**).

Tabela VIII- Análise por PCR em tempo real de genes do UPS após tratamento de *P. falciparum* com ácido indol-3-acético 100 nM durante 5 horas. MER, média da expressão relativa (em $\log_2$); DP, desvio padrão; N, número de experimentos independentes realizados.

Genes	ID	AIA
		MER, DP e N
PF11_0177	Ubiquitina C-terminal hidrolase	-0,53±0,18;3
PFL1790w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	-0,19±0,33;3
PFL1245w	E1 enzima ativadora de ubiquitina	-1,02±0,15;3
PFL0190w	E2 enzima conjugadora de ubiquitina	-0,08±0,37;3
PFL1565c	Proteína hipotética contendo o domínio F-box	-0,56±0,40;3
PFF0960c	Proteína hipotética contendo o domínio F-box	-0,80±0,67;3
PFC0845c	Ubiquitina ligase	-0,20±0,76;3
MAL8P1.23	Ubiquitina ligase	-0,56±0,64;3
MAL13P1.337	Skp1	-0,33±0,61;3
PF08_0094	Culina-like	-1,77±0,12;3
PFF1445c	Culina-like	-0,74±0,61;3
PF14_0025	Subunidade do proteossomo, putativo	-0,46±0,47;3
PFA0400c	Subunidade do proteossomo Beta-3, putativo	0,10±0,78;3
PFI1085w	Ubiquitina-like	-0,38±0,39;3

De acordo com os dados apresentados na **figura 26**, podemos observar pelo menos uma alteração no perfil de ubiquitinação de proteínas em parasitas tratados com melatonina (neste caso em proteína(s) com aproximadamente 70 kDa após 8h de tratamento), o que não é observado em parasitas tratados com AIA no mesmo ponto de tempo.

Figura 26- A- Perfil de ubiquitinação de proteínasde parasitas tratados com melatonina (100 nM) comparapado aos parasitas tratados com AIA (100 nM). Abaixo, membrana corada com coomassie blue utilizada como controle de *loading*. A seta indica a posição das bandas analisadas por densitometria nas 3 condições testadas. B- Densitometria das bandas de interesse com aproximadamente 70 kDa em 8h de tratamento normalizadas pelo *coomassie blue* analisadas pelo programa Image J.

A **figura 26** ilustra apenas um dos três experimentos realizados, e estes, embora apresentem também um perfil diferencial de ubiquitinação, as bandas identificadas contendo os possíveis alvos de ubiquitinação em resposta a melatonina são distintos nos experimentos independentes (dados não mostrados). Porém, em todos eles, a modificação que ocorre em resposta a melatonina não é observada quando há o tratamento com AIA.

Podemos concluir assim que as alterações induzidas pela melatonina não são observadas quando os parasitas são tratados com AIA, pelo menos nas concentrações aqui estudadas. O tratamento não leva a modulação do ciclo intraeritrocítico e também não induz um aumento dos níveis de transcritos dos genes do UPS, embora diminua a abundância de RNA mensageiro do gene da culina (PF08_0094).

4.4 Caracterização do putativo receptor serpentino PfSR12

É proposto que a via de sinalização por melatonina em parasitas da malária ocorra através de receptores de membrana, uma vez que o efeito do hormônio é inibido na presença de luzindole, antagonista de receptores de melatonina (Dubocovich, 1988). Esses receptores, conhecidos para

mamíferos, pertencem ao grupo de receptores acoplados a proteína G (*GPCR G protein coupled receptors*).

Devido ao pouco conhecimento sobre esses receptores no genoma de *P. falciparum*, nosso grupo buscou a identificação de receptores com sete domínios transmembrana, característico de GPCRs também denominados receptores serpentinos (Madeira, Galante et al., 2008).

Embora a identificação de um receptor para a melatonina em *Plasmodium* seja de grande importância para entender a via de sinalização deste hormônio em parasitas da malária, a caracterização de receptores serpentinos *per se* é fundamental, uma vez que esses receptores, além de desempenharem diversas funções celulares, permitindo assim um maior entendimento da biologia do parasita, também são importantes alvos de drogas (Gamo, Sanz et al., 2010).

Dentre os quatro receptores serpentinos identificados pelo nosso grupo: PfSR1, PfSR10, PfSR12 e PfSR25 (Madeira, Galante et al., 2008), o presente trabalho apresenta uma caracterização inicial do receptor PfSR12.

Através de comparação da sequência de aminoácidos por BLASTp, o PfSR12 (número de acesso no Plasmodb PFD1075w) mostrou-se similar à família de receptores GPR180 (Madeira, Galante et al., 2008) que estão envolvidos no remodelamento vascular, expresso principalmente em células endoteliais (Iida, Tanaka et al., 2003, Tsukada, Iwai et al., 2003).

Em busca de maiores indícios sobre a função deste receptor, avaliamos a presença de domínios e motivos na sequência de aminoácidos através da análise pelo programa Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan). Os dados obtidos desta análise estão ilustrados na **figura 27**.

Figura 27- A- Análise de motivos e domínios presentes na sequência de aminoácidos do PfSR12 (PFD1075w). Dados obtidos pelo Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan). B- Topologia do putativo receptor serpentino PfSR12. Predição dos domínios transmembrana utilizando o algoritmo TMHMM e localização do epítipo, na sequência de aminoácidos do PfSR12, selecionado para produção de anticorpo além dos motivos e domínios identificados pela análise do Motif Scan.

A

```

MIRRKWSKIKLAIYFIAFYLLTKIDKCLLKEGELNLSITNVHDNNYMI 50
SEKYNKYYILSLLYKFGGILKEIYDKKIFVKNKSCNNFVSSKVIYGLYN 100
DMNYSKYSNFCFSKANNGVVILSNLYVPNTKFLILDKSDDEIYNYGKNK 150
NGKTCEDELEKIALFVHPLNDIPPELMNKTYFVYQKDIEKSLTDKKNLIL 200
LNCGNKIKNAFKIEFKNNMNFLKNHFSCEEQGLFEIHMLLIVLLFVLSLV 250
YYRKRKLNLTNNVLKEAIIHCSYLLFLLSNILYFIHLISYAFNGSGFSIL 300
KVLSQLIYEAFDCFILVIYYIFNNDMQKKKEETIRVAFTYSILKFIYIL 350
FEIQNNQELDYSTLHSIVALPFVYRIIVAVLNVDNSKKLLKEKTQVDE 400
KFYVLFDTFFYNLWILSIPVQYFLMKSFSLHFTLHVHFFNLYILIYLVY 450
NLSEEKFEVLESKHPYLDLN 470

```

— ATP/GTP-binding site motif A

— Rhodopsin-like GPCR transmembrane domain N-score = 10.946 E-value = 2.4 e-04

— Rhodopsin-like GPCR transmembrane domain N-score = 13.285 E-value = 1.1e-06

B

Dentre os domínios e motivos identificados estão dois domínios de rodopsina-*like* e um motivo de ligação de ATP/GTP.

Receptores tipo GPCR que tem ATP como agonista são conhecidos como receptores purinérgicos do tipo P2Y (Burnstock, 2007). Por outro lado, proteínas que se ligam a GTP são as GTPases, embora tenha sido encontrado em plantas, um receptor tipo GPCR para o ácido abscísico com atividade GTPase intrínseca (Pandey, Nelson et al., 2009).

Por outro lado, receptores rodopsina-*like* representam a maior classe de receptores GPCR. Representantes desta superfamília incluem os receptores para a melatonina, serotonina, receptores purinérgicos e interessante os antígenos Duff, pertencentes ao grupo dos receptores de quimiocinas (Fredriksson, Lagerstrom et al., 2003), este último, presente em eritrócitos, são reconhecidos por *P. vivax* e *P. knowlesi* (Miller, 1977) durante a invasão da hemácia.

Embora a identificação destes domínios e motivos sejam interessantes, validações experimentais são necessárias para certificar-se a possibilidade destas moléculas atuarem como ligantes ou co-reguladores do PfSR12.

4.4.1 Expressão do receptor PfSR12 durante o ciclo intraeritrocítico

Análises anteriores apresentaram por diferentes metodologias dados discrepantes quanto à expressão do PfSR12 no ciclo intraeritrocítico. Enquanto que a expressão analisada por RT-PCR apresentou-se entre 12-18h após a invasão (Madeira, 2006), a expressão analisada por PCR em tempo real ocorreu durante os estágios maduros do ciclo intraeritrocítico (Madeira, Galante et al.,

2008). Assim, avaliamos a expressão do receptor serpentino por RT PCR, utilizando *primers* que flanqueavam toda a ORF do SR12.

De acordo com esta análise, observamos a presença de transcritos a partir de 24 h até 42 h pós-invasão que corresponde ao estágio de trofozoíto a esquizonte (**Figura 28A**) dados esses que corroboram os reportados por (Madeira, Galante et al., 2008).

Para avaliar a expressão protéica, experimentos de *Western blot* foram realizados utilizando-se anticorpos policlonais produzidos contra o epítipo DEKCLLIKEG N-terminal extracelular (predito através de análises pelo programa TMHMM - *TransMembrane prediction using Hidden Markov Models*) do PfSR12.

Figura 28- A- RT-PCR do gene PFD1075w durante o ciclo intraeritrocítico. Tempo em horas pós-invasão B- *Western blot* do receptor PfSR12 (aproximadamente 65kDa) em parasitas assincrônicos (à esquerda) e nos estágios A anel, T trofozoíto e E esquizonte (à direita). A membrana foi corada com *coomassie blue* como controle de *loading*.

B

O peso molecular predito para o PfSR12 é de proximadamente 56 kDa segundo o banco de dados de *Plasmodium*, Plasmodb, entretanto a banda correspondente identificada nos experimentos de *Western blot* apresenta-se um pouco maior, com aproximadamente 65 kDa (**Figura 28B**), o que deve estar relacionado à modificações pós-traducionais, característico de proteínas que são exportadas para a membrana, embora a sequência de aminoácidos apresente sítio de clivagem localizado no 22º aminoácido N-terminal (Madeira, DeMarco et al., 2003) o que diminuiria o tamanho da proteína em aproximadamente 2,4 kDa.

Quando analisamos a expressão do PfSR12 durante os três estágios do ciclo intraeritrocítico, podemos observar que a proteína está presente predominantemente no estágio de esquizonte o que correlaciona com os dados de RT-PCR indicando que há uma maior expressão do gene para o putativo receptor serpentina nos estágios mais maduros do ciclo intraeritrocítico. Uma vez que a concentração protéica foi normalizada e, sabendo-se que a concentração de proteínas no estágio em anel é naturalmente menor do que nos outros estágios (cerca de três vezes), a representatividade do SR12 neste experimento ainda é superestimada.

4.4.2 Localização celular do PfSR12

Para analisarmos a localização subcelular do putativo receptor serpentino, realizamos experimentos de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos específicos para o PfSR12 (**Figura 29B**).

De acordo com as imagens de imunofluorescência obtidas de diversos experimentos, pudemos notar que o receptor serpentino é exportado para a célula hospedeira e encontra-se aparentemente na membrana do eritrócito nas fases jovens (anel e trofozoíto), enquanto que nas fases maduras (esquizonte) a proteína é encontrada apenas no parasita. Isso poderia de certa forma explicar a maior quantidade de proteínas em esquizontes, observada por *Western blot*, uma vez que a extração de proteínas foi realizada com parasitas isolados dos eritrócitos, e assim, as proteínas que se encontram nos eritrócitos são perdidas.

Como controle, utilizamos apenas o anticorpo secundário anti-IgG conjugado a Alexa 488, permitindo-se assim excluir a possibilidade de a imagem observada ser resultante da ligação inespecífica do anticorpo secundário a proteínas que não o anticorpo primário contra o PfSR12. Além disso, hemácias não infectadas não apresentaram fluorescência na presença do anticorpo anti-SR12. O DAPI foi utilizado para marcar o núcleo do parasita facilitando a identificação de hemácias parasitadas.

Figura 29- Localização celular do receptor PfSR12 por imunofluorescência indireta em *P. falciparum*. A Controle negativo utilizando apenas o anticorpo secundário (anti IgG) conjugado ao alexa 488. B- Ensaios de imunofluorescência para o PfSR12 nos estágios anel, trofozoíto e esquizonte. Em verde, anti-PfSR12 utilizando-se anticorpo secundário anti-IgG conjugado a Alexa 488, em azul DAPI, em seguida sobreposição e contraste de fase. H, hemácia não infectada; A, anel; T, trofozoíto; E, esquizonte.

A

B

Após observarmos a presença do PfSR12 na membrana da célula hospedeira, tornou-se necessário avaliar se, como predito, o PfSR12 é uma proteína integral de membrana. Visto que o epítipo selecionado para a produção dos anticorpos ocorre na região N-terminal, numa porção predita extracelular pelo TMHMM, experimentos de imunofluorescência indireta foram realizados em células não-permeabilizadas.

Figura 30- Imunofluorescência indireta do receptor PfSR12 em *P. falciparum* utilizando células não permeabilizadas. Em verde, anti-PfSR12 utilizando-se anticorpo secundário anti-IgG conjugado a Alexa 488, em azul DAPI, em seguida sobreposição e contraste de fase.

Como podemos observar na **figura 30** em células não-permeabilizadas, a marcação do PfSR12 encontra-se perifericamente na membrana da célula hospedeira.

Para avaliar se o transporte do PfSR12 para a membrana do eritrócito ocorre através do mecanismo clássico de transporte de proteínas em eucariotos em que a proteína é exportada após passagem pelo retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi, realizamos ensaios de imunofluorescência indireta utilizando brefeldina A ($5\mu\text{g ml}^{-1}$), um inibidor do transporte do retículo endoplasmático para o Golgi (Benting, Mattei et al., 1994).

Após pelo menos três tratamentos com brefeldina A, observamos que o PfSR12 deixa de ser exportado para o eritrócito e é encontrado apenas no parasita, o que indica que a brefeldina A está inibindo seu transporte para a célula hospedeira (**Figura 31**).

Figura 31- Imunofluorescência do receptor PfSR12 em *P. falciparum* tratados com brefeldina A $5\mu\text{g ml}^{-1}$. Em azul DAPI, em verde anti-PfSR12 utilizando-se anticorpo secundário anti-IgG conjugado a Alexa 488, em sequência, sobreposição e contraste de fase.

Torna-se agora necessário saber qual seria o papel da presença deste possível receptor na membrana do eritrócito apenas nos estágios jovens do ciclo intraeritrocítico. Seria interessante saber também se este receptor é capaz de perceber alguma molécula encontrada no meio extracelular ou se funcionaria apenas como *scaffold* para outros receptores ou outras proteínas. Para tanto, ensaios funcionais assim como o *screening* e validação de ligantes são propostos para que o papel deste putativo receptor seja conhecido.

4.4.3 Genética reversa para o gene do putativo receptor serpentino PFD1075w

Genética reversa é uma das técnicas mais importantes no estudo de função de proteínas. Dentre as várias técnicas para silenciamento gênico está o nocaute por recombinação homóloga. A integração do plasmídeo no DNA cromossômico quase sempre ocorre em regiões homólogas através de eventos de simples recombinação. Isto permite a integração do plasmídeo dentro na região codificante tornando-o inativo ou excluindo a ORF, no caso da integração dupla. Estes

eventos de recombinação exigem uma região homóloga de pelo menos 250 pares de bases do gene de interesse.

Na tentativa de silenciar o gene codificante para o PfSR12, utilizamos um vetor de recombinação simples (pCAM-BSD) cedido pelo Dr. Christian Doerig clonado com uma porção homóloga ao gene endógeno. A construção do vetor de recombinação simples pCAM-BSD foi realizada através de clonagem sítio dirigida.

Para este fim, uma porção do gene correspondente a 300 pb foi amplificada por PCR e clonada no vetor comercial pGEM-T easy. Após purificação do plasmídeo transformado, o inserto foi recuperado digerindo-se o vetor com as enzimas de digestão correspondentes: BamHI e PstI (Figura 32).

Figura 32- Estrutura do plasmídeo pCAM_BSD_PFD1075w à esquerda. BSD, gene de resistência a blasticidina, AMP, gene de resistência à ampicilina, cam5' UTR e HRP2' UTR, promotor e terminador respectivamente que controlam a expressão do gene de resistência à blasticidina. Purificação do vetor (pCAM-BSD) e do inserto (PfSR12) digeridos com BamHI e PstI para posterior ligação.

Para validar a construção, digerimos um dos plasmídeos transformados, selecionado em ampicilina após transformação de bactérias (XL10-gold), com as seguintes combinações de enzimas de restrição: HindIII/NcoI, BamHI/EcoRI, BamHI/NcoI e BamHI/PstI (**Figura 33**).

Figura 33- Confirmação da construção do vetor de nocaute pCAM-BSD-PFD1075w. Canaletas 1,3,5 e 7 correspondem ao plasmídeo sem o inserto. Canaletas 2,4,6 e 8 correspondem ao plasmídeo com a região homóloga do gene PFD1075w inserido.

Após validação da construção do vetor de nocaute, os parasitas foram transfectados e selecionados com 2,5 μ M de blasticidina adicionados ao meio. Após recuperação dos parasitas mantidos com a droga de seleção positiva, blasticidina, realizamos então ciclos de drogas para forçar a integração do plasmídeo no genoma. O ciclo de drogas consiste em manter a cultura com parasitas transfectados na ausência da droga seletiva (blasticidina 2,5 μ g $^{-1}$) e na presença da droga seletiva por pelo menos duas semanas. Este ciclo foi repetido por 3 vezes então analisamos por PCR os parasitas transfectados, utilizando-se *primers* que nos permitiria identificar a integração do plasmídeo no genoma assim como a presença do plasmídeo na forma epissomal.

Figura 34- A- Esquema de recombinação do vetor pCAM-BSD-PFD1075w. E, EcoRV; H, HincII; N, Nco I. Acima o esquema do locus gênico, no centro o vetor de nocaute com a região homóloga e abaixo o locus gênico com a integração do plasmídeo. B- Análise de integração do plasmídeo no genoma por PCR de *P. falciparum* cepa 3D7 *wild type* (WT) e da cepa transfectada com o vetor de nocaute pCAM-BSD-PFD1075w. A-E correspondem às combinações dos oligonucleotídeos dados na tabela.

A

B

	WT	pCAM-SR12
A 1+2	790 pb	~5000 pb
B 3+4	-	900 pb (episomal)
C 1+4	-	400 pb
D 2+3	-	13000 pb
E Fw+Rv	300 pb	300 pb

Podemos notar na **figura 34B**, que através das análises por PCR tanto os parasitas transfectados quanto os parentais (*wild type*) amplificam a região correspondente à porção da ORF endógena do gene PFD1075w. Por outro lado, como esperado, apenas os parasitas transfectados amplificam a região correspondente ao plasmídeo. Contudo nenhum amplificado correspondente a integração do plasmídeo no genoma do parasita foi observada, indicando que o plasmídeo encontra-se apenas episossalmente no parasita.

Desta forma mesmo após novas tentativas, não obtivemos sucesso no silenciamento do gene para o PfSR12, o que impediu que as análises sobre a função do gene previstas pudessem ser realizadas.

A não integração do plasmídeo no genoma de *P. falciparum* pode ser causada por i) ineficiência de recombinação da sequência selecionada ou ii) a ausência do gene *pfsr12* é letal ao parasita no ciclo intraeritrocítico. Contudo nenhuma das duas hipóteses foi confirmada até o presente momento.

5 Discussão

5.1 Implicação do sistema ubiquitina/proteossomo em resposta a melatonina

A participação do sistema de ubiquitina proteossomo em eventos de sinalização é bem conhecida (Ciechanover, 1998).

No presente trabalho, avaliamos o papel da melatonina na modulação dos níveis de transcritos de genes que pertencem ao sistema de ubiquitina/proteossomo UPS e também em promover a ubiquitinação de proteínas alvos.

A capacidade da melatonina em modular os níveis de transcritos de genes do UPS já foi reportada em células de mamíferos (Sung, Cho et al., 2009, Kwon, Kim et al., 2011). Em células neuronais, a melatonina, utilizada de forma a proteger o cérebro de danos causados por isquemia, leva a uma regulação positiva de deubiquitinase (Sung, Cho et al., 2009). De forma contrária, um estudo reportando a modulação transcricional de *P. falciparum* em resposta à temperatura, mostrou que quando o parasita é submetido à 2 h de incubação a 41°C, ocorre regulação negativa de 10 genes do sistema ubiquitina/proteossomo, entre eles dois dos genes analisados no presente trabalho: Ubiquitina ligase (PFC0845c) e Skp1 (MAL13P1.337) (Oakley, Kumar et al., 2007). Este estudo ainda afirma que a 41°C ocorre uma diminuição no padrão de ubiquitinação de proteínas (Oakley, Kumar et al., 2007), efeito contrário ao observado por Horrocks e Newbold (Horrocks, Newbold, 2000). Dos 14 genes de UPS de *P. falciparum* analisados, 12 tiveram aumento nos níveis de transcritos de genes do UPS em resposta a melatonina. Apenas os genes

PFF0960c e MAL13P1.337 não foram modulados. Os níveis de transcritos de oito destes genes analisados aumentam a partir de 20 horas após a invasão (**Figura 35**).

De acordo com os estudos de transcriptoma, os genes parecem ser regulados de forma orquestrada de acordo com a necessidade de cada estágio (Bozdech, Llinas et al., 2003). Desta forma, acredita-se que possivelmente ocorra uma co-regulação de genes com funções similares (Iengar, Joshi, 2009). Para genes do proteossomo, é observada a presença de motivos regulatórios dos grupos G-rich, CACA e TGTATG em 17 dos 28 genes anotados para o grupo funcional. (Iengar, Joshi, 2009). Assim, embora o presente trabalho não avalie todos os genes envolvidos em ubiquitinação, podemos supor que talvez o efeito observado pelo tratamento com melatonina ative um sistema co-regulatório de expressão dos genes UPS. Por outro lado, não podemos descartar a possibilidade de que a tradução do RNA mensageiro esteja sendo inibida, e não que uma indução da transcrição esteja ocorrendo acarretando assim no acúmulo de transcritos.

A perda de resposta a melatonina em parasitas em que a proteína quinase 7 está ausente sugere que a regulação dos níveis de transcritos é de alguma forma modulada pela fosforilação de proteínas regulatórias. Por sua vez, a restauração parcial do efeito em resposta a melatonina em parasitas PK7 complementados pode ser explicada pela expressão da proteína quinase 7 de forma diferente a endógena.

Figura 35- Perfil de abundância de transcritos de genes do sistema ubiquitina/proteossomo (selecionados para nosso estudo), durante ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*.

FONTE: Plasmodb.org baseado em (Otto, Wilinski et al., 2010).

O nosso grupo demonstrou que não apenas a melatonina, mas outros derivados de triptofano como a N-acetil serotonina também são capazes de modular o ciclo intraeritrocítico (Beraldo, Garcia, 2005). No presente trabalho, após tratamento com N-acetil serotonina podemos observar a regulação positiva de 6 dos 14 genes analisados.

Podemos sugerir que estes genes modulados por ambos os compostos seriam os alvos para a modulação do ciclo intraeritrocítico. Visto que a melatonina é uma molécula pleiotrópica, sua ação no parasita pode não se restringir em modular o ciclo intraeritrocítico, ou que este efeito pode ser alcançado por diferentes vias.

Resta-nos então, investigar quais seriam os alvos desta regulação. Dentre os possíveis alvos para degradação via ubiquitina/proteossomo, está a ORC1, importante no processo de replicação do DNA no ciclo celular (Gupta, Mehra et al., 2008). Entretanto esta regulação deve ocorrer mesmo na ausência de melatonina, uma vez que o hormônio não é essencial para o crescimento do parasita.

As tentativas apresentadas neste trabalho em identificar possíveis proteínas sendo diferencialmente ubiquitinadas em resposta a melatonina não foram bem sucedidas e parece-nos que dependendo da duração e do momento em que o parasita é tratado com a melatonina, o padrão de proteínas diferencialmente ubiquitinadas é influenciado dificultando a reprodução dos experimentos. Atualmente tem sido desenvolvidas metodologias para enriquecimento de proteínas ubiquitinadas para avaliar em larga escala essa modificação pós-traducional, e que podem num futuro próximo, ser utilizadas na identificação destes alvos.

5.2 Participação de proteínas quinases na via de sinalização de melatonina

A participação de processos de fosforilação é amplamente conhecida em vias de sinalização. Além disso, nosso grupo verificou a participação de pelo menos três proteínas quinases na via de sinalização por melatonina, PKA, Pfk1 e PK7 (Beraldo, Almeida et al., 2005,

Ribeiro, 2010). Enquanto que a participação da PKA na modulação do ciclo intraeritrocítico do parasita em resposta a melatonina foi investigada através de inibição farmacológica e avaliação da atividade de PKA após tratamento com o hormônio (Beraldo, Almeida et al., 2005), a participação das proteínas quinases PfeIK1 e PK7 foi avaliada em parasitas nocautes para os genes codificantes para essas proteínas (Ribeiro, 2010).

Desta forma, buscamos caracterizar o processo de fosforilação de proteínas em resposta a melatonina. Utilizando-se anticorpos específicos para substratos de PKA, foi possível observar a fosforilação diferencial para algumas proteínas após 5 minutos de tratamento. As tentativas para identificar o possível alvo de fosforilação pela PKA em resposta a melatonina foram mal sucedidas, mas sabemos que dentre os possíveis candidatos a substratos da PKA, estão alguns transportadores (**Tabela IX**) (Neuberger, Schneider et al., 2007). Resta-nos saber se algum deles seria fosforilado de forma diferencial em resposta a melatonina.

Através de experimentos de eletrofisiologia foi reportada a regulação da condutância de canal de ânions pela subunidade regulatória da PKA (Merckx, Nivez et al., 2008). Sabe-se ainda que a PKA está envolvida em diversos processos celulares em *Plasmodium falciparum* tal como seu envolvimento no processo da gametocitogênese (Read, Mikkelsen, 1991). Além disso, é observada uma maior atividade desta quinase no estágio de esquizonte participando no desenvolvimento do parasita no estágio intraeritrocítico (Syin, Parzy et al., 2001) e na invasão dos merozoitos também foram descritas (Leykauf, Treeck et al., 2010). Em adição, estes dados reforçam a participação da PKA na via de sinalização de melatonina na modulação do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*.

Tabela IX- Transportadores putativos substratos de PKA. Análise *in silico* realizada usando PkaPS.

Name	Accession number
ABC transporter (EPP family)	PF14_0244
ABC transporter (MDR family)	PF13_0218
Calcium-transporting ATPase	PFA0310c
Non-SERCA-type Ca ²⁺ -transporting P-ATPase	PFL0590c
Cation transporting P-ATPase	PFE0195w
Cation-transporting ATPase	MAL13P1.246
Amino acid transporter, putative	PFB0435c
Organic anion transporter	PFF0690c
Organic anion transporter	PFF0690c
Novel putative transporter, PfNPT	PFA0245w
Putative transporter	PF11_0310
Folate/biopterin transporter	MAL8P1.139
Transport protein, putative	PF11_0466
Transporter	PFI0720w
Phosphoenolpyruvate:phosphate antiporter, putative	PFE1510c
Calcium antiporter, putative	PFF0170w
Na ⁺ -dependent Pi transporter, sodium-dependent phosphate transporter	MAL13P1.206
Sodium/hydrogen exchanger, Na ⁺ , H ⁺ antiporter	PF13_0019
K ⁺ channel, potassium channel	PFL1315w
ABC transporter (EPP family)	PF14_0244
ABC transporter (MDR family)	PF13_0218

Fonte: (<http://mendel.imp.ac.at/sat/pkaPS/pkaPS.html>), modificado de (Neuberger, Schneider et al., 2007).

A PfPK7 por outro lado atua na modulação dos genes do UPS por melatonina. Seria assim de grande importância conhecer os substratos de PK7, para que a hipótese de ativação transcricional ou a estabilidade de RNAm oferecida pelo tratamento seja elucidada. Avaliando-se a interação predita da PK7 com outras proteínas (Date, Stoeckert, 2006), uma lista contendo 280 proteínas das mais diversas funções foi obtida. Entre elas, duas proteínas avaliadas no presente trabalho: () ubiquitina like(PFC0845c), proteínas de sinalização como a subunidade regulatória da PKA, a calmodulina, GTPases e GTP binding proteins, guanilato ciclase, fosfatase, e interessante, fatores de replicação. Entretanto ainda se faz necessário validar essas interações experimentalmente.

5.3 Irresponsividade de *P. falciparum* ao ácido indol-3-acético ?

O ácido indol-3-acético está envolvido na modulação do crescimento e do desenvolvimento vegetal juntamente com outros fitormônios. O ácido indol-3-acético pertence ao grupo das auxinas, nome este que vem do grego "auxein", que significa “aumentar o crescimento”. Interessantemente, o sistema de ubiquitina/proteossomo tem papel central nessa modulação (Santner, Estelle, 2009). Em adição, receptores para auxina e para o ácido jasmônico são ubiquitinas ligases da família das F-box (Dharmasiri, Dharmasiri et al., 2005, Kepinski, Leyser, 2005, Melotto, Mecey et al., 2008).

A melatonina, por sua vez, como citado anteriormente, pode atuar de forma similar ao AIA em plantas promovendo o crescimento vegetativo (Hernandez-Ruiz, Cano et al., 2004). Além disso, o ritmo circadiano de plantas regula a sinalização deste hormônio (Covington,

Harmer, 2007). De forma similar, a melatonina é amplamente conhecida como hormônio regulador do ciclo circadiano em vertebrados.

Embora AIA seja conhecido como fitormônio, outros organismos como bactérias, e protozoários de ruminantes são capazes de produzir o ácido indol-3-acético a partir de triptofano (Mohammed, Onodera et al., 2003). Sabendo-se disso, investigamos se o AIA poderia de alguma forma influenciar o ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium* uma vez que este parasita i) possui características similares as plantas, como a presença de plastídio (Wilson, Denny et al., 1996) e de proteínas quinases dependentes de cálcio, até então exclusivas de plantas (Zhang, Choi, 2001) e ii) é responsivo a diversos outros compostos derivados de triptofano, como N-acetil serotonina, serotonina, triptamina entre outros (Beraldo, Garcia, 2005). Além disso, AIA é capaz de induzir aumento na concentração de cálcio em plantas (Shishova, Lindberg, 2004) efeito que observamos em *Plasmodium* após adição dos derivados de triptofano citados anteriormente.

Contudo, o ácido indol-3-acético não foi capaz de modular o ciclo intraeritrocítico do parasita da mesma forma que também não observamos regulação positiva de transcritos para genes do sistema ubiquitina/proteossomo após tratamento com AIA, observada em resposta a melatonina e N-acetil serotonina. Porém, após tratamento com AIA o gene PF08_0094 (Culina-like) é regulado negativamente. Este resultado indica que embora os efeitos observados para melatonina e outros derivados de triptofano não ocorram em resposta ao AIA, o parasita poderia perceber de certa forma a presença do composto e modular a expressão gênica, pelo menos do gene para a culina.

Outro fato interessante é que o AIA é um ácido e não atravessa membranas. Em plantas ocorre um sistema de transporte para que a auxina atinja o interior da célula. Assim, no ambiente

da parede celular o pH encontrado é ácido (pH 5,5) e o AIA encontra-se protonado, capaz de atravessar a membrana plasmática. O ambiente intracelular por outro lado apresenta um pH neutro (pH 7) fazendo com que o AIA perca o próton e não consiga sair da célula passivamente (Vieten, Sauer et al., 2007). Além disso, carregadores de auxina foram identificados em diferentes espécies de plantas (Morris, 2000). Assim, a menos que o parasita possua carregadores ou permita que o AIA entre na célula seu efeito só poderia ser percebido através de receptores na membrana do eritrócito.

Há poucos estudos sobre a disponibilidade de AIA no plasma humano, mas sabe-se que AIA pode ser encontrado em concentrações de aproximadamente 600 pmol/ml (Morita, Kawamoto et al., 1992). Além disso, num estudo publicado sobre a metabolômica do parasita, a presença de nenhuma indolamida foi encontrada, embora o triptofano seja encontrado, mesmo que este seja captado da célula hospedeira (Olszewski, Morrissey et al., 2009) o que suporta a ideia de que o parasita realmente utilize o hormônio provindo do hospedeiro.

5.4 Caracterização de receptores serpentinicos em *Plasmodium*

Os receptores serpentinicos, também denominados GPCR, devido à interação com proteínas G, representam a maior classe de receptores, além de compreender várias subfamílias. Embora os receptores serpentinicos estejam altamente representados em genomas de diversos eucariotos, o genoma de *Plasmodium* não apresentava nenhum gene para receptores serpentinicos ou GPCR (Fredriksson, Schioth, 2005, Madeira, Galante et al., 2008) quando em 2004 foi reportado a presença de 46 receptores serpentinicos no genoma de *P. falciparum* (Inoue, Ikeda et al., 2004). Nosso grupo, entretanto, levando em conta esses 46 receptores previamente identificados além de

reanalisar o genoma de *P. falciparum*, identificou a presença de apenas quatro putativos receptores serpentinos (Madeira, Galante et al., 2008). Essa drástica diminuição no número de receptores serpentinos anotados pode ser explicada pelo tipo de análise realizada pelos dois trabalhos. Enquanto o primeiro se baseou apenas na identificação de proteínas com sete domínios transmembrânicos, o segundo levou em consideração a possível função desempenhada pelos genes codificantes excluindo-se assim aqueles que claramente possuísem atividades de proteínas não-GPCRs (Madeira, Galante et al., 2008).

Após a identificação dos quatro putativos receptores serpentinos: PfSR1, PfSR10, PfSR12 e PfSR25 pelo nosso grupo, houve um grande interesse em conhecer a função desses receptores uma vez que eles podem participar de processos vitais para o parasita e perceberem o ambiente ao seu redor como proposto, hormônios produzidos pelo hospedeiro.

Além disso, outra importância em se estudar a função de receptores tipo GPCR ou serpentinos é que eles representam a maior classe de alvo de drogas juntamente com proteínas quinases (Gamo, Sanz et al., 2010).

Desta forma, nosso estudo de caracterização do putativo receptor PfSR12 restringiu-se em avaliar a expressão e localização celular.

De acordo com os nossos dados de RT PCR para o PfSR12, o gene é expresso durante os estágios de trofozoítio e esquizonte corroborando os dados de PCR em tempo real publicados pelo nosso grupo (Madeira, Galante et al., 2008). Essa análise foi importante porque análises anteriores apresentaram dados discrepantes. Enquanto que a expressão analisada por RT-PCR apresentou-se entre 12-18h (Madeira, 2006) a expressão analisada por PCR em tempo real ocorreu durante os estágios maduros do ciclo intraeritrocítico (Madeira, Galante et al., 2008). Além disso,

através de imunofluorescência indireta (embora esta não seja uma técnica quantitativa), podemos observar uma maior quantidade da proteína no interior de parasitas no estágio de esquizontes o que pode sugerir que sejam proteínas recém sintetizadas.

Interessantemente, por imunofluorescência, podemos observar a presença do PfSR12 aparentemente na membrana do eritrócito. Este fato é de grande importância, uma vez que este receptor possa ser utilizado pelo parasita na percepção do ambiente extracelular.

Como é sabido, o parasita induz alterações fisiológicas na membrana do eritrócito com diversas finalidades como, por exemplo, a de promover o transporte de nutrientes através da célula hospedeira (Kirk, 2001). Para que as proteínas sintetizadas pelo parasita cheguem à célula hospedeira, diversos pontos de checagem e sinais apresentados pela proteína a ser exportada são necessários. O motivo PEXEL é um deles, senão o mais importante motivo para proteínas exportadas para o eritrócito (Marti, Baum et al., 2005). Entretanto sabe-se que proteínas non-PEXEL podem também ser exportadas para a célula hospedeira (Lingelbach, 1993, Cooke, Lingelbach et al., 2004). Além disto, é proposto que proteínas com domínio transmembrana sejam exportadas por via diferente às solúveis (Lingelbach, Przyborski, 2006).

Assim, ainda que a sequência de aminoácidos do PfSR12 não possua o domínio PEXEL, não podemos excluir a possibilidade de que outra via de transporte esteja levando a proteína para a célula hospedeira.

Sabemos ainda que o sistema de transporte de proteínas para a membrana ocorre de acordo com a via clássica que envolve a passagem do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, visto que após tratamento com brefeldina, a localização da proteína é totalmente diferente da

observada no controle apresentando-se aparentemente enclausurada (possivelmente no retículo endoplasmático) no citoplasma do parasita.

Neste trabalho ainda tentamos observar se a proteína estava ancorada a membrana do eritrócito. Visto que o anticorpo foi produzido contra um epítipo extracelular realizamos experimentos de imunofluorescência indireta em células não permeabilizadas para esta finalidade e de acordo com estes experimentos, fomos capazes de observar a proteína na membrana do eritrócito infectado. Infelizmente a colocalização do PfSR12 com um marcador de membrana não foi obtida, pois ao tratarmos as células com aglutinina, utilizadas como marcador de membrana por se ligarem a N-acetilglucosamina, não conseguimos mais observar a marcação para o PfSR12. Porém, é plausível supor que proteínas com sete domínios transmembrânicos estejam ancoradas na membrana plasmática.

O nocaute do gene para o estudo da função do PfSR12 também era parte da estratégia de caracterização, mas visto que a integração do plasmídeo no genoma não ocorreu, mesmo após várias tentativas, este objetivo não pode ser concluído. A não integração do plasmídeo no genoma pode sugerir duas hipóteses: a primeira, que talvez a ausência de PfSR12 seja letal ao parasita e a segunda é que a porção homóloga utilizada não seja eficiente para que ocorra recombinação.

Técnicas como RNA de interferência não tem sido bem sucedidas em *Plasmodium* o que poderia ser uma alternativa para o silenciamento, mesmo que parcial, da expressão do gene. Alguns autores atribuem ao insucesso da técnica, a inexistência dos componentes clássicos de RNAi no genoma para que ocorra a degradação do RNA mensageiro (Baum, Papenfuss et al., 2009). Por outro lado, outras técnicas, que não o silenciamento, podem futuramente ser empregadas no estudo da função do PfSR12.

Há ainda a possibilidade do PfSR12 ser um receptor órfão que atue apenas como *scaffold* para outros receptores ou outras proteínas, mas mais uma vez, essa possibilidade ainda não foi explorada.

6 Conclusões

- A adição de 10 μ M melatonina na cultura de *P. falciparum* promove aumento dos níveis de transcritos de genes do UPS após 4-5h de tratamento. A adição de 100 nM do hormônio por sua vez, promove um aumento ainda mais acentuado. O padrão de ubiquitinação de proteínas também sofre alterações após tratamento com melatonina, aparentemente de acordo com o tempo e duração do tratamento, embora ainda não sejam conhecidos os alvos desta modulação;
- Parasitas nocaute para o gene da proteína quinase 7 entretanto, perdem essa capacidade de modulação dos níveis de transcritos do UPS, efeito que é parcialmente restaurado em parasitas complementados;
- Além da melatonina, N-acetil serotonina também é capaz de causar o mesmo efeito em alguns dos genes do UPS aqui testados;
- O AIA por outro lado não é capaz de levar ao aumento dos níveis de transcritos de nenhum dos genes aqui estudados, contudo, foi capaz de diminuir a abundância de transcritos da culina (PF08_0094); E, embora o parasita seja responsivo a diversos derivados de triptofano, o AIA não é capaz de modular o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*.
- Os experimentos que nos permitiram analisar a fosforilação de substratos para a PKA reforçam a participação desta quinase na via de sinalização pela melatonina, resta ainda identificar os possíveis alvos desta proteína quinase;
- A presença do PfSR12 na membrana do eritrócito pode estar relacionada à percepção do ambiente extracelular pelo parasita;

Referências

- Adams J, Behnke M, et al., Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998; 8(4):333-8
- Adams J, Kauffman M Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest*. 2004; 22(2):304-11
- Aikawa M, Miller L H Structural alteration of the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion and intraerythrocytic development. *Ciba Found Symp*. 1983; 94(45-63
- Amino R, Thiberge S, et al., Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*. 2006; 12(2):220-4
- Bagnaresi P, Alves E, et al., Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int J Gen Med*. 2009; 2(47-55
- Bagnaresi P, Markus, RP, Hotta, CT, Pozzan, T, Garcia, CRS Desynchronizing *Plasmodium* cell cycle by a melatonin antagonist: a potential therapeutic target in malaria? *The Open Parasitology Journal*. 2008;
- Bannister L, Mitchell G The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol*. 2003; 19(5):209-13
- Bannister L H, Mitchell G H The fine structure of secretion by *Plasmodium knowlesi* merozoites during red cell invasion. *J Protozool*. 1989; 36(4):362-7
- Bargmann C I Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science*. 1998; 282(5396):2028-33
- Baum J, Papenfuss A T, et al., Molecular genetics and comparative genomics reveal RNAi is not functional in malaria parasites. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(11):3788-98
- Benitez-King G Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res*. 2006; 40(1):1-9
- Benitez-King G, Huerto-Delgadillo L, et al., Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci*. 1993; 53(3):201-7
- Benting J, Mattei D, et al., Brefeldin A inhibits transport of the glycophorin-binding protein from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte. *Biochem J*. 1994; 300 (Pt 3)(821-6
- Benz C, Clayton C E The F-box protein CFB2 is required for cytokinesis of bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007; 156(2):217-24

- Beraldo F H, Almeida F M, et al., Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. J Cell Biol. 2005; 170(4):551-7
- Beraldo F H, Garcia C R Products of tryptophan catabolism induce Ca²⁺ release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. J Pineal Res. 2005; 39(3):224-30
- Billker O, Lindo V, et al., Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. Nature. 1998; 392(6673):289-92
- Birnboim H C, Doly J A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979; 7(15):13-23
- Bockaert J, Pin J P Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. Embo J. 1999; 18(7):1723-9
- Bogyo M, McMaster J S, et al., Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(13):6629-34
- Boyd G H Induced variations in the asexual cycle of *Plasmodium cathemerium*. Am J Hyg. 1929; 9(18):1-7
- Bozdech Z, Llinas M, et al., The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. PLoS Biol. 2003; 1(1):E5
- Bubenik G A Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. Horm Res. 1980; 12(6):313-23
- Budu A, Peres R, et al., N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites. J Pineal Res. 2007; 42(3):261-6
- Burnstock G Purine and pyrimidine receptors. Cell Mol Life Sci. 2007; 64(12):1471-83
- Cambie G, Landau I, et al., Timing niches of 3 species of *Plasmodium* coexisting in a rodent in Central Africa. C R Acad Sci III. 1990; 310(5):183-8
- Cardoso J, Soares M J, et al., Inhibition of proteasome activity blocks *Trypanosoma cruzi* growth and metacyclogenesis. Parasitol Res. 2008; 103(4):941-51
- Ciechanover A The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. Embo J. 1998; 17(24):7151-60
- Cooke B M, Lingelbach K, et al., Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. Trends Parasitol. 2004; 20(12):581-9

- Coppi A, Tewari R, et al., Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host Microbe*. 2007; 2(5):316-27
- Covington M F, Harmer S L The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biol*. 2007; 5(8):e222
- Cowman A F, Crabb B S Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006; 124(4):755-66
- Cox-Singh J, Davis T M, et al., *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(2):165-71
- Date S V, Stoeckert C J, Jr. Computational modeling of the *Plasmodium falciparum* interactome reveals protein function on a genome-wide scale. *Genome Res*. 2006; 16(4):542-9
- de Diego J L, Katz J M, et al., The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry*. 2001; 40(4):1053-62
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, et al., The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. 2005; 435(7041):441-5
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, et al., Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell*. 2005; 9(1):109-19
- Dick L R, Cruikshank A A, et al., Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem*. 1996; 271(13):7273-6
- Dohlman H G, Thorner J, et al., Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem*. 1991; 60(653-88
- Dorin-Semblat D, Sicard A, et al., Disruption of the PfPK7 gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell*. 2008; 7(2):279-85
- Dorin D, Semblat J P, et al., PfPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2005; 55(1):184-96
- Dubocovich M L Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988; 246(3):902-10
- Dubocovich M L Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci*. 1995; 16(2):50-6
- Farias S L, Gazarini M L, et al., Cysteine-protease activity elicited by Ca²⁺ stimulus in *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005; 141(1):71-9

- Fennell C, Babbitt S, et al., PfeIK1, a eukaryotic initiation factor 2 α kinase of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, regulates stress-response to amino-acid starvation. *Malar J.* 2009; 8(99)
- Field S J, Pinder J C, et al., Actin in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1993; 25(1):43-8
- Fredriksson R, Lagerstrom M C, et al., The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003; 63(6):1256-72
- Fredriksson R, Schioth H B The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol.* 2005; 67(5):1414-25
- Gamo F J, Sanz L M, et al., Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature.* 2010; 465(7296):305-10
- Gardner M J, Hall N, et al., Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002; 419(6906):498-511
- Garnham P C, Powers K G Periodicity of infectivity of plasmodial gametocytes: the "Hawking phenomenon". *Int J Parasitol.* 1974; 4(1):103-6
- Gastel J A, Roseboom P H, et al., Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science.* 1998; 279(5355):1358-60
- Gautret P, Deharo E, et al., The adjustment of the schizogonic cycle of *Plasmodium chabaudi* in the blood to the circadian rhythm of the host. *Parasite.* 1995; 2(1):69-74
- Gazarini M L, Beraldo F H, et al., Melatonin triggers PKA activation in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *J Pineal Res.*
- Gazarini M L, Beraldo F H, et al., Melatonin triggers PKA activation in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *J Pineal Res.* 2011; 50(1):64-70
- Goldberg A L, Rock K Not just research tools--proteasome inhibitors offer therapeutic promise. *Nat Med.* 2002; 8(4):338-40
- Guerra-Sa R, Castro-Borges W, et al., *Schistosoma mansoni*: functional proteasomes are required for development in the vertebrate host. *Exp Parasitol.* 2005; 109(4):228-36
- Guerrero J M, Reiter R J Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem.* 2002; 2(2):167-79
- Gupta A, Mehra P, et al., *Plasmodium falciparum* origin recognition complex subunit 5: functional characterization and role in DNA replication foci formation. *Mol Microbiol.* 2008; 69(3):646-65

- Hall R A, Premont R T, et al., Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol.* 1999; 145(5):927-32
- Hardeland R Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans. *Reprod Nutr Dev.* 1999; 39(3):399-408
- Hardeland R, Poeggeler B Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res.* 2003; 34(4):233-41
- Harper J F, Harmon A Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(7):555-66
- Hawking F The clock of the malaria parasite. *Sci Am.* 1970; 222(6):123-31
- Hernandez-Ruiz J, Cano A, et al., Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta.* 2004; 220(1):140-4
- Hershko A, Ciechanover A The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67(425-79
- Horrocks P, Newbold C I Intraerythrocytic polyubiquitin expression in *Plasmodium falciparum* is subjected to developmental and heat-shock control. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; 105(1):115-25
- Hotta C T, Gazarini M L, et al., Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(7):466-8
- Hotta C T, Markus R P, et al., Melatonin and N-acetyl-serotonin cross the red blood cell membrane and evoke calcium mobilization in malarial parasites. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36(11):1583-7
- Hunt P, Afonso A, et al., Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. *Molecular Microbiology* 2007; 65(1):27–40
- Iengar P, Joshi N V Identification of putative regulatory motifs in the upstream regions of co-expressed functional groups of genes in *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics.* 2009; 10(18
- Iida A, Tanaka T, et al., High-density SNP map of human ITR, a gene associated with vascular remodeling. *J Hum Genet.* 2003; 48(4):170-2
- Inoue Y, Ikeda M, et al., Proteome-wide classification and identification of mammalian-type GPCRs by binary topology pattern. *Comput Biol Chem.* 2004; 28(1):39-49
- Ishino T, Yano K, et al., Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biol.* 2004; 2(1):E4
- Janse C J, van Vianen P H, et al., *Plasmodium* species: flow cytometry and microfluorometry assessments of DNA content and synthesis. *Exp Parasitol.* 1987; 64(1):88-94
- Kennaway D J, Voultsios A Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(3):1013-5

- Kepinski S, Leyser O Auxin-induced SCFTIR1-Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCFTIR1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(33):12381-6
- Kepinski S, Leyser O The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. 2005; 435(7041):446-51
- Kirk K Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev*. 2001; 81(2):495-537
- Klein D C, Berg G R, et al., Melatonin synthesis: adenosine 3',5'-monophosphate and norepinephrine stimulate N-acetyltransferase. *Science*. 1970; 168(934):979-80
- Kornitzer D The ubiquitin system and morphogenesis of fungal pathogens. *Isr Med Assoc J*. 2006; 8(4):243-5
- Koyama F C, Chakrabarti D, et al., Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol*. 2009; 165(1):1-7
- Koyama F C, Ribeiro R Y, et al., Ubiquitin proteasome system and the atypical kinase PfPK7 are involved in melatonin signaling in *Plasmodium falciparum*. *J Pineal Res*. 2012;
- Koyama F C, Ribeiro R Y, et al., Ubiquitin Proteasome System and the atypical kinase PfPK7 are involved in melatonin signaling in *Plasmodium falciparum*. *Journal of Pineal Research*. 2011;
- Kreidenweiss A, Kremsner P G, et al., Comprehensive study of proteasome inhibitors against *Plasmodium falciparum* laboratory strains and field isolates from Gabon. *Malar J*. 2008; 7(187
- Krotoski W A, Collins W E, et al., Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1982; 31(6):1291-3
- Kumar P, Wang C C Depletion of anaphase-promoting complex or cyclosome (APC/C) subunit homolog APC1 or CDC27 of *Trypanosoma brucei* arrests the procyclic form in metaphase but the bloodstream form in anaphase. *J Biol Chem*. 2005; 280(36):31783-91
- Kwiatkowski D Febrile temperatures can synchronize the growth of *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Exp Med*. 1989; 169(1):357-61
- Kwon K J, Kim J N, et al., Melatonin synergistically increases resveratrol-induced heme oxygenase-1 expression through the inhibition of ubiquitin-dependent proteasome pathway: a possible role in neuroprotection. *J Pineal Res*. 2011; 50(2):110-23
- Lauer S, VanWye J, et al., Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *Embo J*. 2000; 19(14):3556-64
- Le Roch K G, Johnson J R, et al., Global analysis of transcript and protein levels across the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Genome Res*. 2004; 14(11):2308-18

- Leykauf K, Treeck M, et al., Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. *PLoS Pathog.* 2010; 6(6):e1000941
- Li Q, Gerena L, et al., Development and validation of flow cytometric measurement for parasitemia in cultures of *P. falciparum* vitally stained with YOYO-1. *Cytometry A.* 2007; 71(5):297-307
- Lindenthal C, Weich N, et al., The proteasome inhibitor MLN-273 blocks exoerythrocytic and erythrocytic development of *Plasmodium* parasites. *Parasitology.* 2005; 131(Pt 1):37-44
- Lingelbach K, Przyborski J M The long and winding road: protein trafficking mechanisms in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 147(1):1-8
- Lingelbach K R *Plasmodium falciparum*: a molecular view of protein transport from the parasite into the host erythrocyte. *Exp Parasitol.* 1993; 76(3):318-27
- Livak K J, Schmittgen T D Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-8
- Macias M, Rodriguez-Cabezas M N, et al., Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res.* 1999; 27(2):86-94
- MacPherson G G, Warrell M J, et al., Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol.* 1985; 119(3):385-401
- Madeira L Identificação Molecular de Proteínas Envolvidas na Transdução de Sinal em *Plasmodium falciparum*. Departamento de Parasitologia. 2006; PhD
- Madeira L, DeMarco R, et al., Human malaria parasites display a receptor for activated C kinase ortholog. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 306(4):995-1001
- Madeira L, Galante P A, et al., Genome-wide detection of serpentine receptor-like proteins in malaria parasites. *PLoS ONE.* 2008; 3(3):e1889
- Mailliet F, Ferry G, et al., Characterization of the melatoninergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol.* 2005; 71(1-2):74-88
- Marti M, Baum J, et al., Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. *J Cell Biol.* 2005; 171(4):587-92
- McFadden G I, Reith M E, et al., Plastid in human parasites. *Nature.* 1996; 381(6582):482
- Melotto M, Mecey C, et al., A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J.* 2008; 55(6):979-88

- Meng L, Kwok B H, et al., Eponemycin exerts its antitumor effect through the inhibition of proteasome function. *Cancer Res.* 1999; 59(12):2798-801
- Meng L, Mohan R, et al., Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(18):10403-8
- Merckx A, Echalié A, et al., Structures of *P. falciparum* protein kinase 7 identify an activation motif and leads for inhibitor design. *Structure.* 2008; 16(2):228-38
- Merckx A, Nivez M P, et al., *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog.* 2008; 4(2):e19
- Miller L H Hypothesis on the mechanism of erythrocyte invasion by malaria merozoites. *Bull World Health Organ.* 1977; 55(2-3):157-62
- Mohammed N, Onodera R, et al., Degradation of tryptophan and related indolic compounds by ruminal bacteria, protozoa and their mixture in vitro. *Amino Acids.* 2003; 24(1-2):73-80
- Morita I, Kawamoto M, et al., Difference in the concentration of tryptophan metabolites between maternal and umbilical foetal blood. *J Chromatogr.* 1992; 576(2):334-9
- Morris D A Transmembrane auxin carrier systems--dynamic regulators of polar auxin transport. *Plant Growth Regul.* 2000; 32(2-3):161-72
- Mota M M, Pradel G, et al., Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science.* 2001; 291(5501):141-4
- Neuberger G, Schneider G, et al., pKaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. *Biol Direct.* 2007; 2(1)
- New D C, Wong J T The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in protozoa and ancestral metazoa. *Biol Signals Recept.* 1998; 7(2):98-108
- Nosjean O, Ferro M, et al., Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 2000; 275(40):31311-7
- O'Donnell A J, Schneider P, et al., Fitness costs of disrupting circadian rhythms in malaria parasites. *Proc Biol Sci.* 2011;
- Oakley M S, Kumar S, et al., Molecular factors and biochemical pathways induced by febrile temperature in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* parasites. *Infect Immun.* 2007; 75(4):2012-25
- Olszewski K L, Morrissey J M, et al., Host-parasite interactions revealed by *Plasmodium falciparum* metabolomics. *Cell Host Microbe.* 2009; 5(2):191-9
- Otto T D, Wilinski D, et al., New insights into the blood-stage transcriptome of *Plasmodium falciparum* using RNA-Seq. *Mol Microbiol.* 2010; 76(1):12-24

- Ouyang H, Vogel H J Melatonin and serotonin interactions with calmodulin: NMR, spectroscopic and biochemical studies. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1383(1):37-47
- Pandey S, Nelson D C, et al., Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell*. 2009; 136(1):136-48
- Plakidou-Dymock S, Dymock D, et al., A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr Biol*. 1998; 8(6):315-24
- Ponts N, Yang J, et al., Deciphering the ubiquitin-mediated pathway in apicomplexan parasites: a potential strategy to interfere with parasite virulence. *PLoS ONE*. 2008; 3(6):e2386
- Read L K, Mikkelsen R B *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes contain an adenylate cyclase with properties which differ from those of the host enzyme. *Mol Biochem Parasitol*. 1991; 45(1):109-19
- Reiter R J, Acuna-Castroviejo D, et al., Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 939(200-15
- Reiter R J, Tan D X, et al., Melatonin in plants. *Nutr Rev*. 2001; 59(9):286-90
- Reiter R J, Tan D X, et al., Circadian mechanisms in the regulation of melatonin synthesis: disruption with light at night and the pathophysiological consequences *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 2011; 1((1)):13-22
- Reynolds J M, El Bissati K, et al., Antimalarial activity of the anticancer and proteasome inhibitor bortezomib and its analog ZL3B. *BMC Clin Pharmacol*. 2007; 7(13
- Ribeiro R Y Papel das quinases PfPK7, PfNEK2, PfNEK3, PfMAP1 e PfeIK1 na transdução de sinal de melatonina no desenvolvimento do ciclo celular intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*. Depto. de Parasitologia. 2010; Mestrado
- Rouzine I M, McKenzie F E Link between immune response and parasite synchronization in malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(6):3473-8
- Santner A, Estelle M Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*. 2009; 459(7250):1071-8
- Schmitz S, Grainger M, et al., Malaria parasite actin filaments are very short. *J Mol Biol*. 2005; 349(1):113-25
- Schuck D C, Ribeiro R Y, et al., Flow Cytometry as a Tool for Analyzing Changes in *Plasmodium falciparum* Cell Cycle Following Treatment with Indol Compounds. *Cytometry part A*. 2011;
- Shaw M K, He C Y, et al., Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 2000; 121 (Pt 1)(35-47

- Shishova M, Lindberg S Auxin induces an increase of Ca^{2+} concentration in the cytosol of wheat leaf protoplasts. *J Plant Physiol.* 2004; 161(8):937-45
- Sinden R E Sexual development of malarial parasites. *Adv Parasitol.* 1983; 22(153-216
- Sturm A, Amino R, et al., Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* 2006; 313(5791):1287-90
- Sung J H, Cho E H, et al., Identification of proteins differentially expressed by melatonin treatment in cerebral ischemic injury--a proteomics approach. *J Pineal Res.* 2009; 46(3):300-6
- Syin C, Parzy D, et al., The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks *Plasmodium falciparum* development in infected erythrocytes. *Eur J Biochem.* 2001; 268(18):4842-9
- Taliaferro W H T a L G Alteration in time sporulation of *Plasmodium Brazilianum* in monkeys by reversal of light and dark. *American Journal of Epidemiology.* 1934; 20(50-9
- Tan D X, Manchester L C, et al., Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1472(1-2):206-14
- Thines B, Katsir L, et al., JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature.* 2007; 448(7154):661-5
- Tonkin C J, van Dooren G G, et al., Localization of organellar proteins in *Plasmodium falciparum* using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method. *Mol Biochem Parasitol.* 2004; 137(1):13-21
- Toure-Ndouo F S, Zang-Edou E S, et al., Relationship between in vivo synchronicity of *Plasmodium falciparum* and allelic diversity. *Parasitol Int.* 2009; 58(4):390-3
- Trager W, Jensen J B Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 1976; 193(4254):673-5
- Tsukada S, Iwai M, et al., Inhibition of experimental intimal thickening in mice lacking a novel G-protein-coupled receptor. *Circulation.* 2003; 107(2):313-9
- Vieten A, Sauer M, et al., Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.* 2007; 12(4):160-8
- Wiesenberg I, Missbach M, et al., The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor Neurol Neurosci.* 1998; 12(2-3):143-50
- Wilson R J, Denny P W, et al., Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol.* 1996; 261(2):155-72
- Woelk T, Sigismund S, et al., The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div.* 2007; 2(11
- Wojcikiewicz R J Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25(1):35-41

Zhang X S,Choi J H Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. *J Mol Evol.* 2001; 53(3):214-24

Anexos

Review

Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in *Plasmodium*Fernanda C. Koyama^a, Debopam Chakrabarti^b, Célia R.S. Garcia^{a,*}^a Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^b Department of Molecular Biology & Microbiology, Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, FL 32826, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 September 2008

Received in revised form 27 December 2008

Accepted 7 January 2009

Available online 21 January 2009

Keywords:

Plasmodium

Malaria

Serpentine receptor

Calcium

Kinases

ABSTRACT

The regulation of the *Plasmodium* cell cycle is not understood. Although the *Plasmodium falciparum* genome is completely sequenced, about 60% of the predicted proteins share little or no sequence similarity with other eukaryotes. This feature impairs the identification of important proteins participating in the regulation of the cell cycle. There are several open questions that concern cell cycle progression in malaria parasites, including the mechanism by which multiple nuclear divisions is controlled and how the cell cycle is managed in all phases of their complex life cycle. Cell cycle synchrony of the parasite population within the host, as well as the circadian rhythm of proliferation, are striking features of some *Plasmodium* species, the molecular basis of which remains to be elucidated. In this review we discuss the role of indole-related molecules as signals that modulate the cell cycle in *Plasmodium* and other eukaryotes, and we also consider the possible role of kinases in the signal transduction and in the responses it triggers.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	1
2. Receptors: the upstream part of signaling pathways	2
3. Protein kinases: signal transducers	3
3.1. Calcium modulated protein kinases	3
3.2. Cyclic nucleotide-dependent pathway	4
3.3. MAP kinase pathway	4
3.4. CDK-like kinases and other putative cell cycle kinases	4
3.5. Novel FIKK kinases	5
4. Concluding remarks	5
Acknowledgements	5
References	5

1. Introduction

The molecular mechanisms responsible for eukaryotic cell cycle control are likely to have been highly conserved during evolution. There is indeed evidence that fundamental principles are conserved between yeast and mammals [2]. However, yeast and metazoans are both members of the same phylum (*Opisthokont*) [3] and

much more detailed analysis in different eukaryotic groups is needed before a full picture can be established. In addition to its importance in fundamental biology, research into cell cycle control carries a strong potential for application in drug discovery. Many elements of the cell cycle control machinery are important targets for the development of new drugs against cancer and other pathologies. The many unusual features of eukaryotic pathogens (including *Plasmodium* spp.) suggest that cell cycle control could be selectively targeted to create a new range of anti-parasitic drugs.

Plasmodium has a complex life cycle alternating between two hosts (1) mosquitoes, in which sexual reproduction occurs, and

* Corresponding author at: Rua do Matão, travessa 14, n. 321, Cidade Universitária, São Paulo - 05508-090, Brazil. Tel.: +55 11 30917518; fax: +55 11 30918095.

E-mail address: cgarcia@usp.br (C.R.S. Garcia).

(2) a vertebrate, where *Plasmodium* invades and multiplies asexually in erythrocytes and hepatocytes. The parasite undergoes major metabolic and morphological changes as it exploits its two hosts, with periods of intensive cell division as it multiplies during sporozoite formation (sporogony) in the mosquito gut wall, and in the liver and red blood cells (schizogony) of the vertebrate host.

The intraerythrocytic phase is the cause of malaria pathogenesis. This phase consists of cycles of invasion, multiplication and reinfection. It begins with the invasion of erythrocytes by merozoites and continues into growth (ring and trophozoite stages), formation of multiple new merozoites (schizont stage) and finally release into the bloodstream of merozoites that in turn will infect new erythrocytes.

In *Plasmodium falciparum*, the most virulent of the four *Plasmodium* species that infect humans, and in the rodent malaria parasite *P. chabaudi*, the erythrocytic cycle events usually occur synchronously during *in vivo* infection but synchrony is lost in *in vitro* cultures, presumably because some defining factor present in the host is absent from the culture medium. There are artificial ways of restoring synchrony of *P. falciparum* *in vitro*, such as temperature elevation [4] or the addition of sorbitol [5] which, however is not related to normal control since it entails the killing of all but ring stages. Of greater biological significance is the reported modulation of synchrony of *P. falciparum* by host tryptophan-derived molecules [6].

The cell cycle comprises a range of highly ordered events that lead to mitosis and the formation of new cells. Regulation of these conserved processes is critical to normal cellular growth, differentiation and replication. According to Hammarton et al. [7] merozoites and rings are in G1, and the S phase begins when the parasite is at trophozoite stage, while in schizont stage, merozoites are produced by successive rounds of poorly understood mitosis [1]. To regulate these processes cells employ several mechanisms including phosphorylation, transcription control and degradation of regulatory proteins by the proteasome complex.

2. Receptors: the upstream part of signaling pathways

In many instances the sensing of environmental cues and ensuing signal transduction are crucial to initiate the cell cycle and/or cell differentiation [8]. These occur when a stimulus binds to a receptor and promotes downstream responses such as transcription regulation, alterations in metabolism, cell proliferation and apoptosis, all mediate by second messengers and effectors. Cells may sense a range of stimuli such as hormones, light, growth factors, cytokines and other molecules, and each cell type may express its own repertoire of receptors detecting specific signals. The more spread family of receptor is GPCR (G-protein coupled receptors) which are involved in a range of physiological processes.

Many organisms use external molecular signals to drive cell differentiation. Examples include several species of amoebae, which modulate encystation by sensing hormones such as catecholamines by means of transmembrane receptors [9], and fungi that secrete molecules inducing cell differentiation [10]. Indole is an important signaling molecule not only in eukaryotes, but also in bacteria, where it has been implicated in quorum sensing processes [11] and in the cell cycle control of *Escherichia coli* [12].

Within cells, second messengers like calcium and cAMP are able to promote a range of intracellular responses. An increase in cytosolic calcium concentration is caused by the release of calcium from intracellular pools such as the endoplasmic reticulum [13], mitochondria [14] and acidocalcisomes [15,16] and also by influx through the plasma membrane. In *Plasmodium* there are several reports from different labs implicating calcium signaling at several stages of the life cycle, including erythrocytic schizo-

gony, gametogenesis, ookinete motility, [17,18]. Moreover increase of intracellular second messengers concentration as cAMP and calcium are involved in a range of signaling events in *Plasmodium* signaling such as in tryptophan-derived response [19,20] and in sporozoite apical regulated exocytosis [21]. cAMP also inhibits maturation of merozoites in RBCs [22] and is able to promote sexual differentiation [23–25].

Since Martin et al. [26] reported that gametocytes of *P. falciparum* produce InsP_3 during exflagellation it is possible that calcium increase via PLC could be caused by InsP_3 . Furthermore Passos and Garcia [27] promote *in vitro* calcium increase by adding InsP_3 in *P. falciparum* culture.

Another second messenger, cGMP and subsequently PKG activation together with calcium release are crucial for xanthurenic acid-induced gametogenesis into mosquito [28].

As already mentioned, synchrony of erythrocytic schizogony in some *Plasmodium* species occurs *in vivo* and is lost *in vitro*. In *P. falciparum*, treatment of trophozoites with melatonin activates a calcium/cAMP-dependent response that, at least *in vitro*, is able to synchronize their intraerythrocytic stages [29]. Other tryptophan-derivatives such as tryptamine, N-acetylserotonin, and serotonin also promote changes in the *Plasmodium* cell cycle [20,30]. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK), a product of melatonin degradation, is able to synchronize *P. chabaudi* and *P. falciparum* proliferation [31].

Furthermore, in *P. chabaudi*, erythrocyte rupture and reinvasion occur approximately between midnight and 3 a.m., which coincides with the circulating melatonin peak level. When *P. chabaudi* infects pinealectomized mice, which lack melatonin, synchrony is lost but melatonin administration is able to restore it; this effect of melatonin is inhibited by the addition of luzindole (a melatonin antagonist) [19]. Administration of a suboptimal concentration of the anti-malarial drug, chloroquine in addition to luzindole reduces significantly the mortality of mice infected with *P. chabaudi* [32].

Calcium release caused by melatonin treatment also activates several cysteine-proteases acting in erythrocyte rupture, hemoglobin and cytoskeletal proteins degradation [33]. Interestingly, it has been found in the laboratory of one of the authors that in contrast to *P. chabaudi* and *P. falciparum*, asynchronous *P. berghei* is insensitive to melatonin with respect to both $[\text{Ca}^{2+}]$ increase and cell cycle modulation [34].

In vertebrates, melatonin receptors belong to the family of G-protein coupled receptors (GPCRs), also called seven transmembrane (7TM) receptors [35]. This family is widespread in eukaryotes. To mention just two examples, *Dictyostelium discoideum* uses GPCR signaling for many cellular processes including development [36], and the parasitic helminth *Schistosoma mansoni* uses a GPCR to sense histamine and to trigger cell responses via calcium and cAMP [37].

Madeira et al. [38] identified four putative serpentine receptors in *P. falciparum* and their functions are under analysis. Their predicted roles in sensing extracellular signals, possibly in the form of host hormones or other molecules, make these four putative receptors potentially very interesting, and elucidation of their detailed function may shed light on how the parasite modulates its life cycle in response to its environment Fig. 1 depicts schematic model for molecular signaling machineries in *Plasmodium*.

It has been proposed that hormones might influence malarial infection, for example in pregnant women infected with *P. falciparum* [39].

Although trimeric G-proteins are not found in *Plasmodium* genome, experiments with cholera and pertussis toxin brought evidences about its expression at the intraerythrocytic stage [25]. The inhibition of $\text{G}\alpha\text{s}$ protein with peptides diminished *P. berghei* parasitemia [40]. On the other hand it is reported that $\text{G}\alpha\text{s}$ present in erythrocytes is recruited to the malarial vacuole [41].

Fig. 1. Schematic pathway of signaling in *Plasmodium*. AC adenylate cyclase, camK calcium/calmodulin kinase B, PDE phosphodiesterase, PLC phospholipase C, PKA protein kinase A, PKG protein kinase G PV parasitophorous vacuole, N nuclei, SR serpentine receptor. Tryptophan-derivatives are able to increase cytoplasmic calcium through PLC. Calcium increase activates adenylate cyclase that convert AMP in cAMP once the concentration of such molecule is augmented in response to calcium increase by melatonin. cAMP is able to bind the regulatory subunit of PKA (cyclic AMP-dependent protein kinase) leading to an allosteric change in conformation which causes unleashing of the catalytic subunits becoming it activated and able to phosphorylate its targets. The molecular downstream effects of calcium and PKA in this pathway are proposed.

The knowledge of the downstream mechanisms involved in signal transduction pathways in *Plasmodium* is fundamental to understand parasite biology. Protein kinases (PKs) are an important family of proteins that are expected to regulate diverse cellular activities. In the sections below we present a brief overview of current knowledge on *Plasmodium* kinases.

3. Protein kinases: signal transducers

The *P. falciparum* genome sequence contains 85 or 99 protein kinases (PK)-related sequences, depending on the study [42,43]. The number is rather low in comparison to the size of the kinome in *Saccharomyces cerevisiae*: while the yeast genome contains a similar number of total genes to that of *P. falciparum*, it possesses significantly more PKs. This low number might be attributed to the intracellular lifestyle of the parasite, which is likely to receive less environmental cues than a free-living unicellular eukaryote. However, complex life cycle stages of malaria parasites in mosquito and the vertebrate host entail intricate regulatory mechanisms where protein kinases are expected to be key molecules. Therefore, it is possible that malaria PKs may possess particularly complex cellular functions. Given that many *Plasmodium* PKs have atypical features compared to their eukaryotic homologues they are predicted to be promising targets for antimalarial development [42,44].

3.1. Calcium modulated protein kinases

Calcium-mediated intracellular signaling is increasingly being found to be important for an assortment of cellular function in apicomplexans, and calcium signaling has been implicated in the response of *Plasmodium* to melatonin [29,45]. A major class of downstream effector of Ca^{2+} -mediated signal transduction in *Plasmodium* is the CDPK family. These proteins have a conserved NH_2 -terminal ser/thr protein kinase domain that is fused to a COOH-terminal calmodulin-like domain containing four EF-hand

calcium-binding sites; proteins sharing a similar domain organization are found in plants and Alveolates, but not in metazoans. The majority of PfCDPK genes exhibit significant expression in the sexual stages [42]. Elegant reverse genetics work in *P. berghei* by Billker et al. showed that CDPK4 is a key enzyme in male gamete formation, regulating entry into S phase during gametocyte activation [17]. CDPK4 also exhibits a potential role in sporogonic development because there is a significant reduction of mosquito infectivity of ookinetes derived from ΔCDPK4 macrogametes [17]. The *Plasmodium* CDPK3 is exclusively expressed in the ookinetes [46]. Although *cdpk3* disrupted *P. berghei* lines exhibited normal exflagellation and development into ookinetes, their transmission efficiency is severely affected as evidenced by reduction of the number of oocyst in the midgut [46,47]. The reason for this drop in oocyst number was shown to be due to a defect in gliding motility [46,47]. CDPK6 is another CDPK that is dispensable for the asexual cycle; *P. berghei* parasites lacking CDPK6 are competent for sporozoite formation, but the sporozoites are significantly less infective for hepatocytes than wild-type parasites [48]. In contrast, PfCDPK1 is essential for erythrocytic schizogony [49] and is localized to parasite or parasitophorous vacuolar membrane [50], consistent with a proposed role in motility. The targeting of PfCDPK1 to these membranes was found to be dependent on the N-terminal dual acylation and basic residue motifs. Interestingly, Raf kinase inhibitor protein (RKIP) ortholog, which is also a protein kinase C (PKC) substrate in mammals, modulates PfCDPK1 activity *in vitro* [51]. Whether or not PfCDPK1 functions like PKC in *Plasmodium* remains to be established, but these results highlights atypical properties of *Plasmodium* kinases that cannot be discerned simply based on homology because many of these proteins are expected to possess parasite-specific functions. It is interesting to note that a receptor for activated protein kinase C (PfRack) has been identified in *Plasmodium* [52].

The importance of Ca^{2+} in the intracellular signaling of malaria parasites is exemplified by the existence of a novel

Ca^{2+} /calmodulin-regulated protein kinase B (PfPKB). Unlike the mammalian PKB, the PfPKB does not contain the N-terminal pleckstrin homology domain that interacts with phosphoinositides to regulate its activity. Instead this novel N-terminal region of PfPKB exhibits Ca^{2+} -dependent interaction with calmodulin for its activation [53]. Involvement of phospholipase C (PLC) in PfPKB activation was suggested as U73122, a specific inhibitor of phospholipase C, inhibited kinase activity [53]. Recently, it has been shown that treatment with a peptide inhibitor that competes with calmodulin binding to PKB and A443654, a small-molecule inhibitor of PKB, inhibits invasion of merozoites [54]. PfPKB was also shown to phosphorylate PfGAP45, a glideosome-associated protein, suggesting its role in invasion [54].

It has been also shown that the cGMP-dependent protein kinase (PKG) in *P. falciparum* may function upstream of events that mobilize Ca^{2+} and is likely to be a key regulator of gametogenesis [28]. While the anticoccidial PKG inhibitor compound 1 inhibits gametocyte rounding up and subsequent exflagellation, gametocytes in which inhibitor-insensitive PKG has been incorporated in the genome, through allelic replacement, rounds up normally [28].

It is evident that Ca^{2+} is an important second messenger that regulates various cellular processes in *Plasmodium* (Fig. 1). To elucidate the cellular response to Ca^{2+} signals in malaria parasites it will be important to understand the mechanism by which the Ca^{2+} level is regulated and the role of different Ca^{2+} -regulated proteins.

3.2. Cyclic nucleotide-dependent pathway

Cyclic nucleotide monophosphates, cAMP and cGMP are important second messengers in eukaryotic cell synthesized by adenylyl cyclases (PfAC) and guanylyl cyclases (PfGC), respectively. Malaria genome encodes two distinct PfACs [55]. PfAC α contains six potential transmembrane domains at the N-terminus that have structural features of voltage-gated K^+ channel and a C-terminal adenylyl cyclase domain. The unique features of PfAC α suggest that the changes in ion conductance may be coupled to cAMP synthesis. The PfAC β is related to a family of soluble ACs found in photosynthetic bacteria and humans [56]. It has been shown that cAMP may have a role in sexual differentiation of the parasite [24,57]. In eukaryotes, one of the major roles of cAMP synthesized by ACs is to activate cAMP-dependent protein kinase (PKA) by binding to the inhibitory regulatory subunit PKAr. *P. falciparum* PKA catalytic (PKAc) [58] and the regulatory subunits have been characterized [59]. Using patch-clamp technique in infected erythrocytes, it has been shown that either addition of PfPKAr or overexpression of PfPKAr in *trans* leads to down-regulation of host cell anion conductance. Furthermore, PfPKAr overexpressing line exhibits reduced growth, which could be corrected by increasing the intracellular cAMP level [59].

Two guanylyl cyclases, PfGC α and PfGC β with catalytic activity have been identified in *P. falciparum* [60]. Interestingly, the PfGCs appear to be bifunctional as they also contain P-ATPase domain at the N-terminal extension [56,60]. The PfGC α gene is expressed in both asexual and sexual stages [61] and cannot be deleted [62] suggesting its essentiality. Although previous pharmacological studies suggested the role of cGMP in exflagellation, recently it has been shown that the disruption of PfGC β has no effect on gametogenesis [62]. However, disruption of phosphodiesterase PfPDE δ gene affects gametogenesis. This suggests the importance of PfPDE in maintaining the level of cGMP during sexual development of the parasite.

3.3. MAP kinase pathway

The mitogen-activated protein (MAP) kinases play a central role in coordinating activity of multiple intracellular mediators. *P. fal-*

ciparum genome encodes two homologues of MAP kinases [42], *pfmap-1* and *pfmap-2*, and both loci have been disrupted to understand their function. While *pfmap-1* knock-out lines do not have any phenotype in erythrocytic schizogony and sporogony, *pfmap-2* is essential for asexual growth and the loci can only be disrupted when an episomal copy of *pfmap-2* is present suggesting its essentiality [63]. Interestingly, the *P. berghei* homologue of PfMAP-2 was shown to be nonessential in asexual stages and gametocytes but is important for male gamete formation [64,65]. It is noteworthy that there are no unambiguous orthologues of MAP kinase kinase (MAPKK) or MEK in *P. falciparum*. PfPK7 appears to be a novel chimeric protein whose C-terminal region has identity with MEKs, whereas the N-terminal lobe shows homology to fungal protein kinase A [66]. Furthermore, PfPK7 does not contain the activation site in its T-loop and is insensitive to MEK and PKA inhibitors [67]. Recent determination of PfPK7 structure at 3.7 Å resolution showed, however, that its structure is similar to TAO2 kinase, a MAP3KKK [68]. Although PfPK7 was not essential for the asexual growth, malaria parasites in which *pfpk7* locus was disrupted grows slowly with a reduced number of merozoites per segmenters compared to the wild type [66]. PfPK7 deficient parasite lines also have severe defects in oocysts production [66].

Recently, it has been suggested that PfNek3, one of the *P. falciparum* homologue of NIMA-like kinases that are involved in cell cycle regulation, particularly G2/M transition, in eukaryotes [69] activates PfMAP2 *in vitro* through phosphorylation, a feature that had previously been described for Pfnek-1 [70–72]. These results underscore unique function of *Plasmodium* kinases that will be difficult to perceive by homology analysis. NIMA-related kinases (NEKs) usually regulate cell cycle progression in eukaryotes [73]. *Plasmodium* genome encodes four homologues of these proteins that are expressed mainly in gametocytes [74]. Although PfNek4 is expressed in gametocytes, its disruption in the *P. berghei* has no influence in gamete formation or fertilization of gametes but differentiation of zygotes to ookinetes is interrupted [75]. PbNek4 was shown to be essential for the replication of diploid zygote genome before meiosis ensues.

3.4. CDK-like kinases and other putative cell cycle kinases

Although the developmental stages of malaria parasite are unique and complex, it is expected that proteins belonging to the CDK-related subfamily will be key regulators in the *Plasmodium* similar to eukaryotic cell cycle. Among the Pf protein kinases clustering within the CMGC group (to which CDKs and MAP kinases belong), PfPK5 clusters with CDK1/2 and Pfcrk-1 with CDK10/11. PfPK5 was the first CDK-like kinase characterized in *P. falciparum* with 60% identity to human CDK1 [76]. PfPK5 is expressed throughout erythrocytic schizogony, and immunoprecipitation experiments using synchronized parasite extracts showed that PfPK5 activity peaks at the schizont stage around 36 h post-invasion [77,78]. PfPK5 also colocalizes with the nuclear stain [78]. The structure of PfPK5 has been determined to a resolution of 1.9 Å [79]. PfPK5 has structural homology to human CDK2, the only other monomeric CDK structure solved.

PfPK6 is novel protein showing identity to both CDKs and MAP kinases by differential display RT-PCR of mRNA samples undergoing transition from ring to schizonts [80]. Molecular modeling data suggests that PfPK6 is more closely related to the CDKs [81,82] rather than MAP kinases. The PSTAIRE motif is replaced by a SKCILRE sequence in PfPK6, but the sites of regulatory phosphorylation are conserved. PfPK6 appears to be a novel cyclin-independent kinase. Another CDK-related kinase identified was Pfmrk, a homologue of the Mo15/CDK7 CDK-activating kinase [83]. Recombinant Pfmrk displays very little histone kinase activity as a monomer, but can be activated by the presence of human cyclin H and Pfcyclin-1

[84,85]. Recently, it was shown that Pfmrk is activated by PfMAT1 homologue in presence of cyclin, similar to what is observed with CDK7/cyclinH-MAT complex in other eukaryotes [86]. Pfcrc-1, Pfcrc-3, and Pfcrc-5 are other CDK-like kinases [81]. Pfcrc-1 is not expected to be a functional homolog of eukaryotic CDK1/2; instead it belongs to the p58GTA gene family that is a negative regulator of cell growth [87]. Pfcrc-1 exhibits peak expression in gametocytes, but the *P. berghei* orthologue was shown to be essential for completion of the asexual cycle [88]. Four *P. falciparum* cyclin homologues, Pfcyc1–4, have been identified [84,89]. Pfcyc1 has maximum homology to the cyclin H family, an activator of CDK7. As expected, Pfcyc1 activated Pfmrk (a putative CDK7 homologue) [85] but, surprisingly, Pfcyc-1 also activated Pfpk5 [84]. Members of the cyclin H family are specific activators of CDK7 and not CDK1 or CDK5 (to which Pfpk5 has the highest homology). Pfpk5 has also been shown to be activated by mammalian cyclin A, p25 and RINGO [74,84,89]; such promiscuity for various cyclin-related proteins has not been reported for mammalian or yeast CDKs. Both p25 and RINGO are non-cyclin CDK activators from vertebrates. Three additional cyclins, Pfcyc2, Pfcyc3, and Pfcyc4 have been identified recently [90]. Pull-down and co-immunoprecipitation experiments showed that these cyclins associate with histone H1 kinase activity in parasite extracts. Furthermore, Pfcyc3 activates Pfpk5 *in vitro*.

3.5. Novel FIKK kinases

Of all Pfpks identified, the presence of a novel family of 20 PKs is particularly noteworthy [42,90]. This family of kinases is termed FIKK based on a conserved amino acid sequence motif present [42]. All family members contain a non-conserved N-terminal domain and a conserved kinase domain in the C-terminus. The FIKK kinases contain all residues that are important for catalytic activity except the Glycine triad in subdomain I. The N-terminal domain is not conserved among paralogs and this region contains a stretch of hydrophobic residues corresponding to a predicted trans-membrane or signal sequence [90]. A recently described host-targeting (HT) signal motif RxSRILAExxx [91] is present in six FIKK paralogs, whereas the *Plasmodium* export element (Pexel) RxLx(D, E, Q) [92] can be detected in all FIKK paralogs downstream of the signal sequence. Because HT/PEXEL motifs have been shown to mediate export of proteins beyond the parasitophorous vacuole into the erythrocyte cytoplasm [91,92], it is expected that FIKK kinases are trafficked to erythrocytes. Indeed, GFP-fusion protein of one of the FIKK kinases, FIKK12, was shown to be exported to the erythrocytes and associates with Maurer's clefts [93]. Although protein kinase activity of FIKK12 was detected in immunoprecipitates [93], recombinant FIKK 11 and FIKK 10.1 did not show any protein kinase activity using a peptide phosphorylation motif array [Turk and Chakrabarti, unpublished]. FIKK kinases may have a role in parasite-induced signaling events, given that members of this family are exported into the erythrocytes, associate with Maurer's clefts, and one of the paralogs, R45, is trafficked to the host cell membrane [94].

4. Concluding remarks

The knowledge of signaling transduction pathways in *Plasmodium* is fundamental to aid the design of new strategies against malaria. The finding that *Plasmodium* possesses serpentine receptors [38] opens new possibilities to dissect the upstream mechanisms through which *Plasmodium* senses the environment. On the other hand, the use of second messengers by parasites such as cAMP and calcium has long been suggested in the literature and finding their target could bring invaluable information regarding *Plasmodium* cell biology. Together with downstream mechanisms

for signaling in *Plasmodium* they will provide a more complete picture of how *Plasmodium* signaling handling machinery is put in action.

Precise delineation of *Plasmodium* protein kinase functions as key regulators of cellular events will be a major challenge of the post-genome project era. It is apparent from earlier discussions that it will be difficult to ascertain physiological roles of Pf kinases simply based on homology because many of these proteins are expected to possess parasite-specific function as a means of regulating complex life cycle events. Therefore, characterization of physiological function of *Plasmodium* kinases will not be a mere repetition of what is already known in model organisms but will provide novel parasite specific information and fill a major gap in our understanding of the malaria parasite life cycle. Studies on the malarial protein kinases, their regulators and substrates will also provide new avenues of drug design targeting intraerythrocytic stages. Targeting protein kinase substrates rather than typical ATP-binding pocket will allow us to inhibit specific physiological events. Although targeting protein–protein interactions can be challenging because of complexity and diversity of binding surfaces, there have been recent progresses towards developing such therapeutic intervention approaches [95]. One such method is known as ‘fragment assembly’ that probes large chemical space as seen with interacting surfaces between proteins [96–98]. Alternatively, interfering peptidomimetics can also be developed. A long-term goal of this project is to use similar approaches can be utilized to identify molecular entity targeting malaria parasite kinases.

Acknowledgements

We thank Fundação de Amparo à pesquisa de São Paulo (Fapesp) and MS-CNPq for funding C.R.S.G. F.C.K. received fellowship from FAPESP. The work in D.C. laboratory is supported in part by a National Institutes of Health Grant AI73795. We thank Dr. Christian Doerig for critical reading the manuscript.

References

- Naughton JA, Bell A. Studies on cell-cycle synchronization in the asexual erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 2007;134(Pt 3): 331–7.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002;419(6906):498–511.
- Baldauf SL. The deep roots of eukaryotes. *Science* 2003;300(5626):1703–6.
- Kwiatkowski D. Febrile temperatures can synchronize the growth of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *J Exp Med* 1989;169(1):357–61.
- Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979;65(3):418–20.
- Hotta CT, Markus RP, Garcia CR. Melatonin and N-acetyl-serotonin cross the red blood cell membrane and evoke calcium mobilization in malarial parasites. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(11):1583–7.
- Hammarton TC, Mottram JC, Doerig C. The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Prog Cell Cycle Res* 2003;5:91–101.
- Garcia CR, de Azevedo MF, Wunderlich G, Budu A, Young JA, Bannister L. *Plasmodium* in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008;266:85–156.
- Coppi A, Merali S, Eichinger D. The enteric parasite *Entamoeba* uses an autocrine catecholamine system during differentiation into the infectious cyst stage. *J Biol Chem* 2002;277(10):8083–90.
- Kugler S, Schurtz Sebghati T, Groppe Eissenberg L, Goldman WE. Phenotypic variation and intracellular parasitism by histoplasma *Capsulatum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(16):8794–8.
- Lee J, Jayaraman A, Wood TK. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol* 2007;7:42.
- Chant EL, Summers DK. Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids. *Mol Microbiol* 2007;63(1):35–43.
- Varotti FP, Beraldo FH, Gazarini ML, Garcia CR. *Plasmodium falciparum* malaria parasites display a THG-sensitive Ca²⁺ pool. *Cell Calcium* 2003;33(2):137–44.
- Gazarini ML, Garcia CR. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca²⁺ fluctuations. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321(1):138–44.
- Garcia CR, Ann SE, Tavares ES, Dluzewski AR, Mason WT, Paiva FB. Acidic calcium pools in intraerythrocytic malaria parasites. *Eur J Cell Biol* 1998;76(2):133–8.

- [16] Marchesini N, Luo S, Rodrigues CO, Moreno SN, Docampo R. Acidocalcinsomes and a vacuolar H⁺-pyrophosphatase in malaria parasites. *Biochem J* 2000;347(Pt 1):243–53.
- [17] Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, Brinkmann V. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* 2004;117(4):503–14.
- [18] Caldas ML, Wasserman M. Cytochemical localisation of calcium ATPase activity during the erythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 2001;31(8):776–82.
- [19] Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, et al. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol* 2000;2:466–546.
- [20] Beraldo FH, Garcia C. Products of tryptophan catabolism induce Ca²⁺ release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Pineal Res* 2005;39:224–30.
- [21] Ono T, Cabrita-Santos L, Leitao R, et al. Adenylyl cyclase and cAMP signaling mediate *Plasmodium* sporozoite apical regulated exocytosis and hepatocyte infection. *PLoS Pathog* 2008;4(2):e1000008. doi:10.1371/journal.ppat.1000008.
- [22] Inselburg J. Gametocyte formation by the progeny of single *Plasmodium falciparum* schizonts. *J Parasitol* 1983;69:584–91.
- [23] Kaushal DC, Carter R, Miller LH, Krishna G. Gametocytogenesis by malaria parasites in continuous culture. *Nature* 1980;286:490–2.
- [24] Trager W, Gill GS. *Plasmodium falciparum* gametocyte formation in vitro: its stimulation by phorbol diesters and by 8-bromo cyclic adenosine monophosphate. *J Protozool* 1989;36:451–4.
- [25] Dyer M, Day K. Expression of *Plasmodium falciparum* trimeric G proteins and their involvement in switching to sexual development. *Mol Biochem Parasitol* 2000;110:437–48.
- [26] Martin SK, Jett M, Schneider I. Correlation of phosphoinositide hydrolysis with exflagellation in the malaria microgametocyte. *J Parasitol* 1994;80(3):371–8.
- [27] Passos A, Garcia C. Inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca²⁺ release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite *P. chabaudi*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:155–60.
- [28] McRobert L, Taylor CJ, Deng W, et al. Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. *PLoS Biol* 2008;6(June (6)):e139.
- [29] Gazarini ML, Thomas AP, Pozzan T, Garcia CR. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J Cell Biol* 2003;161(1):103–10.
- [30] Beraldo FH, Mikoshiba K, Garcia CR. Human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, displays capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the *P. falciparum* cell cycle. *J Pineal Res* 2007;43(4):360–4.
- [31] Budu A, Peres R, Bueno VB, Catalani LH, Garcia CR. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites. *J Pineal Res* 2007;42(3):261–6.
- [32] Bagnaresi P, Markus RP, Hotta CT, Pozzan T, Garcia CRS. Desynchronizing *Plasmodium* cell cycle increases chloroquine protection at suboptimal doses. *Open Parasitol J* 2008;2:55–8.
- [33] Farias SL, Gazarini ML, Melo RL, et al. Cysteine-protease activity elicited by Ca²⁺ stimulus in *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol* 2005;141(1):71–9.
- [34] Bagnaresi P, Alves E, da Silva HB, Epiphany S, Mota MM, Garcia CRS. Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int J Gen Med* 2009.
- [35] Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 1995;16(2):50–6.
- [36] Prabhu Y, Mondal S, Eichinger L, Noegel AA. A GPCR involved in post aggregation events in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* 2007;312(1):29–43.
- [37] Hamdan FF, Abramovitz M, Mousa A, Xie J, Durocher Y, Ribeiro P. A novel *Schistosoma mansoni* G protein-coupled receptor is responsive to histamine. *Mol Biochem Parasitol* 2002;119(1):75–86.
- [38] Madeira L, Galante PA, Budu A, Azevedo MF, Malnic B, Garcia CR. Genome-wide detection of serpentine receptor-like proteins in malaria parasites. *PLoS ONE* 2008;3(3):e1889.
- [39] Nunes MC, Scherf A. *Plasmodium falciparum* during pregnancy: a puzzling parasite tissue adhesion tropism. *Parasitology* 2007;134(Pt 13):1863–9.
- [40] Harrison T, Samuel BU, Akompong T, et al. Erythrocyte G protein-coupled receptor signaling in malarial infection. *Science* 2003;301:1734.
- [41] Lauer S, VanWye J, Harrison T, et al. Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *EMBO J* 2000;19(14):3556–64.
- [42] Ward P, Equinet L, Packer J, Doerig C. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genom* 2004;5(1):79.
- [43] Anamika, Srinivasan N, Krupa A. A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. *Proteins* 2005;58(1):180–9.
- [44] Doerig C. Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 2004;1697(1–2):155–68.
- [45] Nagamune K, Moreno SN, Chini EN, Sibley LD. Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. *Subcell Biochem* 2008;47:70–81.
- [46] Ishino T, Orito Y, Chinzei Y, Yuda M. A calcium-dependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. *Mol Microbiol* 2006;59(4):1175–84.
- [47] Siden-Kiamos I, Ecker A, Nyback S, Louis C, Sinden RE, Billker O. *Plasmodium berghei* calcium-dependent protein kinase 3 is required for ookinete gliding motility and mosquito midgut invasion. *Mol Microbiol* 2006;60(6):1355–63.
- [48] Coppi A, Tewari R, Bishop JR, et al. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host Microb* 2007;2(5):316–27.
- [49] Kato N, Sakata T, Breton G, et al. Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to *Plasmodium falciparum* motility. *Nat Chem Biol* 2008;4(6):347–56.
- [50] Moskes C, Burghaus PA, Wernli B, Sauder U, Durrenberger M, Kappes B. Export of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 1 to the parasitophorous vacuole is dependent on three N-terminal membrane anchor motifs. *Mol Microbiol* 2004;54(3):676–91.
- [51] Kugelstadt D, Winter D, Pluckhahn K, Lehmann WD, Kappes B. Raf kinase inhibitor protein affects activity of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 1. *Mol Biochem Parasitol* 2007;151(1):111–7.
- [52] Madeira L, DeMarco R, Gazarini ML, Verjovski-Almeida S, Garcia CR. Human malaria parasites display a receptor for activated C kinase ortholog. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306(4):995–1001.
- [53] Vaid A, Sharma P. PPKB, a protein kinase B-like enzyme from *Plasmodium falciparum*: II. Identification of calcium/calmodulin as its upstream activator and dissection of a novel signaling pathway. *J Biol Chem* 2006;281(37):27126–33.
- [54] Vaid A, Thomas DC, Sharma P. Role of Ca²⁺/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2008;283(9):5589–97.
- [55] Muhia DK, Swales CA, Eckstein-Ludwig U, et al. Multiple splice variants encode a novel adenylyl cyclase of possible plastid origin expressed in the sexual stage of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2003;278(24):22014–22.
- [56] Baker DA, Kelly JM. Purine nucleotide cyclases in the malaria parasite. *Trends Parasitol* 2004;20(5):227–32.
- [57] Kaushal DC, Carter R, Miller LH, Krishna G. Gametocytogenesis by malaria parasites in continuous culture. *Nature* 1980;286(5772):490–2.
- [58] Syin C, Parzy D, Traincard F, et al. The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks *Plasmodium falciparum* development in infected erythrocytes. *Eur J Biochem* 2001;268(18):4842–9.
- [59] Merckx A, Nivez MP, Bouyer G, et al. *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog* 2008;4(2):e19.
- [60] Carucci DJ, Whitney AA, Muhia DK, et al. Guanylyl cyclase activity associated with putative bifunctional integral membrane proteins in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2000;275(29):22147–56.
- [61] Young JA, Fivelman QL, Blair PL, et al. The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: a microarray analysis using ontology-based pattern identification. *Mol Biochem Parasitol* 2005;143(1):67–79.
- [62] Taylor CJ, McRobert L, Baker DA. Disruption of a *Plasmodium falciparum* cyclic nucleotide phosphodiesterase gene causes aberrant gametogenesis. *Mol Microbiol* 2008;69(1):110–8.
- [63] Dorin-Semblat D, Quashie N, Halbert J, et al. Functional characterization of both MAP kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by reverse genetics. *Mol Microbiol* 2007;65(5):1170–80.
- [64] Rangarajan R, Bei AK, Jethwaney D, et al. A mitogen-activated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep* 2005;6(5):464–9.
- [65] Tewari R, Dorin D, Moon R, Doerig C, Billker O. An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol Microbiol* 2005;58(5):1253–63.
- [66] Dorin-Semblat D, Sicard A, Doerig C, Ranford-Cartwright L. Disruption of the PPK7 gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* 2008;7(2):279–85.
- [67] Dorin D, Semblat JP, Pouillet P, et al. PPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2005;55(1):184–96.
- [68] Merckx A, Echallier A, Langford K, et al. Structures of *P. falciparum* protein kinase 7 identify an activation motif and leads for inhibitor design. *Structure* 2008;16(2):228–38.
- [69] Osmani SA, Pu RT, Morris NR. Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell* 1988;53(2):237–44.
- [70] Lye YM, Chan M, Sim TS. Pfk3: an atypical activator of a MAP kinase in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett* 2006;580(26):6083–92.
- [71] Low H, Lye YM, Sim TS. Pfk3 functions as an atypical MAPKK in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361(2):439–44.
- [72] Dorin D, Le Roch K, Salicandro P, et al. Pfk-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* biochemical properties and possible involvement in MAPK regulation. *Eur J Biochem* 2001;268(9):2600–8.
- [73] O'Connell MJ, Krien MJ, Hunter T. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol* 2003;13(5):221–8.
- [74] Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, et al. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* 2003;301(5639):1503–8.
- [75] Reininger L, Billker O, Tewari R, et al. A NIMA-related protein kinase is essential for completion of the sexual cycle of malaria parasites. *J Biol Chem* 2005;280(36):31957–64.

- [76] Ross-Macdonald PB, Graeser R, Kappes B, Franklin R, Williamson DH. Isolation and expression of a gene specifying a cdc2-like protein kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem* 1994;220(3):693–701.
- [77] Graeser R, Wernli B, Franklin RM, Kappes B. *Plasmodium falciparum* protein kinase 5 and the malarial nuclear division cycles. *Mol Biochem Parasitol* 1996;82(1):37–49.
- [78] Graeser R, Franklin RM, Kappes B. Mechanisms of activation of the cdc2-related kinase PfpK5 from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;79(1):125–7.
- [79] Holton S, Merckx A, Burgess D, Doerig C, Noble M, Endicott J. Structures of *P. falciparum* PfpK5 test the CDK regulation paradigm and suggest mechanisms of small molecule inhibition. *Structure* 2003;11(11):1329–37.
- [80] Bracchi-Ricard V, Barik S, Delvecchio C, Doerig C, Chakrabarti R, Chakrabarti D. PfpK6, a novel cyclin-dependent kinase/mitogen-activated protein kinase-related protein kinase from *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 2000;347(Pt 1):255–63.
- [81] Doerig C, Endicott J, Chakrabarti D. Cyclin-dependent kinase homologues of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 2002;32(13):1575–85.
- [82] Manhani KK, Arcuri HA, da Silveira NJ, Uchoa HB, de Azevedo Jr WF, Canduri F. Molecular models of protein kinase 6 from *Plasmodium falciparum*. *J Mol Model* 2005;12(1):42–8.
- [83] Li JL, Robson KJ, Chen JL, Targett GA, Baker DA. Pfmrk, a MO15-related protein kinase from *Plasmodium falciparum*. Gene cloning, sequence, stage-specific expression and chromosome localization. *Eur J Biochem* 1996;241(3):805–13.
- [84] Le Roch K, Sestier C, Dorin D, et al. Activation of a *Plasmodium falciparum* cdc2-related kinase by heterologous p25 and cyclin H. Functional characterization of a *P. falciparum* cyclin homologue. *J Biol Chem* 2000;275(12):8952–8.
- [85] Waters NC, Woodard CL, Prigge ST. Cyclin H activation and drug susceptibility of the Pfmrk cyclin dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2000;107(1):45–55.
- [86] Chen Y, Jirage D, Caridha D, et al. Identification of an effector protein and gain-of-function mutants that activate Pfmrk, a malarial cyclin-dependent protein kinase. *Mol Biochem Parasitol* 2006;149(1):48–57.
- [87] Doerig C, Horrocks P, Coyle J, et al. Pfcrc-1, a developmentally regulated cdc2-related protein kinase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1995;70(1–2):167–74.
- [88] Rangarajan R, Bei A, Henry N, et al. Pbcrc-1, the *Plasmodium berghei* orthologue of *P. falciparum* cdc-2 related kinase-1 (Pfcrc-1), is essential for completion of the intraerythrocytic asexual cycle. *Exp Parasitol* 2006;112(3):202–7.
- [89] Merckx A, Le Roch K, Nivez MP, et al. Identification and initial characterization of three novel cyclin-related proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2003;278(41):39839–50.
- [90] Schneider AG, Mercereau-Puijalon O. A new Apicomplexa-specific protein kinase family: multiple members in *Plasmodium falciparum*, all with an export signature. *BMC Genom* 2005;6(1):30.
- [91] Hiller NL, Bhattacharjee S, van Ooij C, et al. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 2004;306(5703):1934–7.
- [92] Marti M, Good RT, Rug M, Knuepfer E, Cowman AF. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 2004;306(5703):1930–3.
- [93] Nunes MC, Goldring JP, Doerig C, Scherf A. A novel protein kinase family in *Plasmodium falciparum* is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell. *Mol Microbiol* 2007;63(2):391–403.
- [94] Bonnefoy S, Guillotte M, Langsley G, Mercereau-Puijalon O. *Plasmodium falciparum*: characterization of gene R45 encoding a trophozoite antigen containing a central block of six amino acid repeats. *Exp Parasitol* 1992;74(4):441–51.
- [95] Arkin MR, Wells JA. Small-molecule inhibitors of protein–protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3(4):301–17.
- [96] Boehm HJ, Boehringer M, Bur D, et al. Novel inhibitors of DNA gyrase: 3D structure based biased needle screening, hit validation by biophysical methods, and 3D guided optimization. A promising alternative to random screening. *J Med Chem* 2000;43(14):2664–74.
- [97] Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* 1996;274(5292):1531–4.
- [98] Erlanson DA, Braisted AC, Raphael DR, et al. Site-directed ligand discovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(17):9367–72.

Ubiquitin proteasome system and the atypical kinase PfPK7 are involved in melatonin signaling in *Plasmodium falciparum*

Abstract: We previously reported that melatonin modulates the *Plasmodium falciparum* erythrocytic cycle by increasing schizont stage population as well as diminishing ring stage population. In addition, the importance of calcium and cAMP in melatonin signaling pathway in *P. falciparum* was also demonstrated. Nevertheless, the molecular effectors of the indoleamine signaling pathway remain elusive. We now demonstrate by real-time PCR that melatonin treatment up-regulates genes related to ubiquitin/proteasome system (UPS) components and that luzindole, a melatonin receptor antagonist, inhibits UPS transcription modulation. We also show that protein kinase PfPK7, a *P. falciparum* orphan kinase, plays a crucial role in the melatonin transduction pathway, since following melatonin treatment of *P. falciparum* parasites where *pfpk7* gene is disrupted (*pfpk7*⁻ parasites) (i) the ratio of asexual stages remain unchanged, (ii) the increase in cytoplasmatic calcium in response to melatonin was strongly diminished and (iii) up-regulation of UPS genes did not occur. The wild-type melatonin-induced alterations in cell cycle features, calcium rise and UPS gene transcription were restored by re-introduction of a functional copy of the *pfpk7* gene in the *pfpk7*⁻ parasites.

Fernanda C. Koyama^{1,2}, Ramira Y. Ribeiro^{1,2}, Julio L. Garcia², Mauro F. Azevedo¹, Debopam Chakrabarti³ and Célia R. S. Garcia²

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, FL, USA

Key words: kinase, malaria, melatonin, signaling, ubiquitin

Address reprint requests to Célia Regina da Silva Garcia, Rua do Matão, travessa 14, n. 321. Cidade Universitária, CEP 05508-090, São Paulo, Brazil.
E-mail: cgarcia@usp.br

Received November 1, 2011;
Accepted January 13, 2012.

Introduction

Malaria remains a major infectious disease in the developing world. Despite all effort to control the disease, drug resistance and antigenic variations are important obstacles. Signaling pathways that control the development of the pathogenic asexual intraerythrocytic forms through ring, trophozoite and schizont stages of *Plasmodium falciparum*, the etiological agent of the most severe form of human malaria, are essentially uncharacterized. Thus, advances in this area might identify novel targets for intervention [1].

Our group has shown that asexual blood stage *P. falciparum* parasites respond to melatonin (and its derivatives, tryptamine, serotonin N-acetyl serotonin and N1-acetyl-N2-formyl-5-metoxkyneuramine) by modulating their proliferation cycle in vitro. The melatonin treatment causes increase in the schizont population, the proliferative stage, as well as restoring synchrony of *P. chabaudi* in infected pinealectomized mice [2–4]. Interestingly, melatonin does not cause any change in intraerythrocytic stages of *P. berghei* and *P. yoelii*, asynchronous parasites [5].

It is known that melatonin-induced signaling pathway involves a cross talk between calcium and cAMP signaling

[6, 7] whose role in *Plasmodium* development has been the subject of numerous studies [8–17], for review please see [18]. Furthermore, the importance of phosphorylation in melatonin signaling was determined through protein kinase A activity and its inhibition assays [6, 19].

In this paper, we tested whether other protein kinases could be involved in melatonin-induced cycle modulation. *Plasmodium falciparum* protein kinase 7 (PfPK7) is a kinase with no orthologues in mammalian cells. Its C-terminal region has highest sequence similarity to mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKs or MEK) while its N-terminal segment is more similar to fungal protein kinase A [20]. Interestingly, the 3D structure of PfPK7 displays maximal similarity to TAO2 kinase, a MAPKKK [21]. However, neither PKA nor MEK inhibitors block PfPK7 activity [20].

Dorin-Semlat et al. [22] reported a slower parasite growth caused by a reduction in the number of merozoites produced by individual schizonts, and a block in oocyst formation, in parasites with disrupted *pfpk7* gene. In view of the phenotype of *pfpk7*⁻ that involves reduced invasion efficiency, we tested the effect following melatonin treatment in these parasites, by investigating whether this

atypical kinase is involved in the melatonin response pathway. To confirm that the absence of the PfPK7 is really the cause of the phenotypes found in the knockout parasites, we tested a complemented line where *pfpk7* is introduced back to the *pfpk7*- parasites via an episome [22]. As negative controls, we monitored a possible cell cycle phenotype in *P. falciparum* parasites with disrupted *pfnek-2* [23] or *pfnek-3* genes, both of which are expressed predominantly in gametocytes.

Similar to phosphorylation, ubiquitin/proteasome system (UPS) plays important roles in fundamental processes of eukaryotic cells, including cell cycle regulation, signal transduction and transcription regulation [24]. Ubiquitination occurs basically through three enzymatic steps in which ubiquitin moiety are transferred to substrate. Briefly, E1-activating enzyme activates ubiquitin in an ATP-dependent process. Activated ubiquitin is then transferred to an E2-conjugating enzyme that in turn transfers it to an E3 ubiquitin ligase that recognizes specifically the substrate. Specific attachment of ubiquitin molecules leads the substrate to proteasomal degradation or to other fate [25].

Transcriptome analysis of *P. falciparum* showed that genes encoding proteasome components are activated in schizont stage [26]. Reverse transcriptase PCR assay showed that steady-state level of mRNA from the poly-ubiquitin gene is up-regulated in late trophozoite to schizont, when protein ubiquitination dramatically increases [27], suggesting the participation of UPS in parasite growth and development. This is consistent with the observation that proteasome inhibitors such as MLN-273 and bortezomib block *Plasmodium* development [28, 29].

Material and methods

Parasites

The 3D7 clone of *P. falciparum* was cultivated in flasks with RPMI 1640 medium (GIBCO, Billings, MT, USA) supplemented with 0.04% of gentamicin sulfate, 0.05% of hypoxanthine and 10% human serum (blood group A⁺) and 0.23% sodium bicarbonate, as previously described [30]. For *pfpk7*⁻ parasite, the same medium was supplemented with 2.5 µg/mL blasticidin.

Distribution of developmental stages in response to melatonin treatment

After incubation for 24 hr with 0.1 µM melatonin (or solvent: ethanol 0.00005%), an aliquot of cells was removed and parasitemia was assessed by counting 2000 cells on Giemsa-stained slides. Vehicle blanks (no drug) were analyzed as controls. Proportions of the different parasite forms were determined by analyzing 2000 cells at the same conditions for parasitemia. Triplicate smears were prepared for each drug concentration and for controls, and at least three isolated experiments were carried out. All determinations were carried out in double-blind conditions. Results are means from three separate cell preparations. Data were analyzed in GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) using ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

Real-time PCR

Parasite cultures were synchronized by sorbitol treatment [31], and trophozoites were treated with 0.1 µM melatonin (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or luzindole 250 µM (Tocris Bioscience, Bristol, UK) approximately 24–30 hrs postinvasion. The RNA was extracted 5 hrs posttreatment with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and subjected to DNase treatment. cDNA synthesis was carried out using random primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. SYBR green incorporation was measured during PCR amplification performed on the 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We performed the statistical analysis applying Student's *t* test on the log₂ values of relative expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$) of the genes (normalized with 18S ribosomal housekeeping gene). The experiments were performed independently at least three times, and each experiment was analyzed in triplicate by real-time PCR.

Calcium spectrofluorimetric determinations

A total of 10⁸ infected red blood cells were lysed with 10 mg/mL saponin (in PBS). Parasite pellets were obtained by centrifugation (8700 g for 10 min at 4°C), washed twice in buffer A (116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 5.5 mM D-glucose, 50 mM MOPS and 2 mM CaCl₂, pH 7.2) and resuspended in the same buffer as described previously (Farias et al., 2005). For cytoplasmic calcium staining, we incubated parasites in the presence of Fluo4AM 5 mM and probenecid 40 µM for 50 min at 37°C. In each experiment, an aliquot of 100 µL (10⁵ cells) was placed in a thermostated cuvette equipped with magnetic stirring. The experiments were performed independently three times. Spectrofluorometric measurements were performed by using the RF-5301PC (Shimadzu) with excitation and emission wavelengths of 488 nm and 505–530 nm, respectively.

Results

Melatonin is able to modulate *P. falciparum* cell cycle [2, 32] and treatment of cultures with the indoleamine results in synchronization by increasing the proportions of schizont while diminishing ring stage proportion. However, when similar experiments were performed with the *pfpk7*- (clone B9) [22], we did not observe any change in the distribution of parasite development stages as was seen for wild-type parasites (Fig. 1 and Table S1).

To confirm that the absence of the effect of melatonin in *pfpk7*- parasites was indeed because of the lack of the PfPK7 enzyme, we repeated the experiment with a complemented line where PfPK7 is introduced back to the *pfpk7*- parasites via an episome [22]. Fig. 1D shows the changes in the distribution of developmental stages in response to 0.1 µM melatonin treatment. The wild-type phenotype is restored in the complemented clone resulting in an increase in the schizont population with a corresponding decrease in ring population compared to the control.

Fig. 1. Melatonin does not affect the cell cycle of *pfpk7*⁻ parasites. Parasite culture was treated with melatonin (MLT) (or vehicle) for 24 hr. Proportions of the different parasite forms (ring, trophozoite and schizont) were determined by analyzing 2000 cells in triplicates. The data show the average of three independent experiments. Addition of melatonin in *Plasmodium falciparum* 3D7 causes a modulation in the distribution of developmental stages in the intraerythrocytic cycle (A, C). However, this modulation is lost in *pfpk7*⁻ parasites (clone B9) (B). Upon complementation of the KO parasite with an extra copy of the *pfpk7* gene, the effect of melatonin is restored (D). Statistical analysis by ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test. * $P < 0.05$.

In contrast, transgenic parasite clones unable to express the gametocyte-specific (stage not found in our parasite culture) NIMA-related kinases PfNek-2 [23] or PfNek-3 behaved as wild-type parasites in response to melatonin, confirming that the defect in the melatonin response in *pfpk7*⁻ parasites was not due to nonspecific effects (Fig. 2).

Addition of either melatonin or tryptophan derivatives to the culture medium of *P. falciparum* trophozoites induces an increase in cytosolic calcium from intracellular storages, and this response is blocked by a PLC inhibitor U73122 [2,

6, 7]. The inhibition of calcium rise with PLC inhibitor U73122 also abolishes melatonin-induced intraerythrocytic cycle modulation, suggesting that the synchronization of cell cycle is modulated by a calcium-dependent pathway [2, 4, 6].

As *pfpk7*⁻ parasites do not respond to melatonin-induced intraerythrocytic developmental cycle modulation, we investigate the ability of melatonin to induce calcium release in *pfpk7*⁻ parasites. For this purpose, trophozoites were loaded with the calcium sensor Fluo-4 and fluores-

Fig. 2. Knockout of *pfnek-2* and *3* does not affect melatonin signaling. Parasite culture was treated with melatonin (MLT) (or vehicle) for 24 hr. Proportions of the different parasite forms (ring, trophozoite and schizont) were determined by analyzing 2000 cells in triplicates. The data show the average of three independent experiments. Addition of melatonin in *Plasmodium falciparum* 3D7 causes a modulation in the distribution of developmental stages in the intraerythrocytic cycle (A, C). The modulation persists in *pfnek-2*⁻ (B) and *pfnek-3*⁻ parasites (D). Statistical analysis by ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test. * $P < 0.05$.

Fig. 3. Calcium rise in response to melatonin in *pfpk7*⁻ strain. Fluorimetric calcium measure in melatonin treated wild-type 3D7, *pfpk7*⁻ parasites (clone B9), and in the *pfpk7*-complemented clone B9 (see Materials and methods). The data show the average of three independent experiments.

cence changes were measured upon hormone addition. The concentration of cytosolic calcium released upon addition of 0.1 μ M melatonin was measured. We found that calcium rise in response to melatonin was diminished from approximately 50 nM in wild-type 3D7 to <20 nM in *pfpk7*⁻ cells (Fig. 3). As expected, the phenotype similar to the wild-type parasites was restored, albeit partially in the complemented Pfpk7 clone, where calcium release reaches approximately 40 nM. This confirms that the lack of response in the disrupted line is indeed due at least partly to the absence of the enzyme. We can hypothesize that possibly PK7 act in a way similar to the PKA modulation of calcium in mammalian cells [33].

We also investigated whether the UPS could be affected by melatonin treatment, as this system is involved in a broad range of cellular functions including signal transduction, cell cycle control and others. There are about 100 genes encoding UPS components in *P. falciparum*, most of them comprising E3 ubiquitin ligases [34]. We selected 14 genes, about 14% of UPS genes, representing E1, E2, E3, ubiquitin-like, deubiquitinase and proteasome subunits to assess the profile of transcript level upon melatonin 0.1 μ M treatment by real-time PCR. We also included non-UPS genes (PFI1485c encoding a diacylglycerol kinase, PF13_0252 encoding a nucleoside transporter 1 and MAL13P1.216 encoding a DNA helicase) as control to ensure that gene expression modulation is specific rather than a general increase in transcript level. Our data show that 5 hrs of 0.1 μ M melatonin treatment of *P. falciparum* trophozoite-infected RBCs (approximately 24–30 hr post-invasion) resulted in up-regulation of at least two times of a subset of UPS genes (Fig. 4 and Table S2), including the E1-activating enzymes (PFL1790w and PFL1245w), an

Fig. 4. Plasmodium ubiquitin/proteasome system (UPS) genes are up-regulated upon melatonin treatment. Differential transcription of UPS genes from parasites subjected to melatonin treatment compared to control was analyzed by real-time PCR (A) and in the presence of luzindole, both using 18S ribosomal RNA for normalization. At least three independent experiments were performed (See Table S2). See Materials and methods for statistical treatment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The criterion for altered gene expression was twofold (up or downregulation). The ID of the genes are available in Supporting information.

E2-conjugating enzyme (PFL0190w), two E3 ubiquitin ligases (MAL8P1.23 and PFC0845c), the deubiquitinating enzyme (PF11_0177) and two proteasome subunits (PF14_0025 and PFA0400c). Cullin-like proteins (PF08_0094 and PFF1445c), an E3 ubiquitin protein ligase RING finger (PFC0845c) that belongs to SCF complex (Skp1-Cullin-F-box), all of which are involved in UPS activity (reviewed in [34]), as well as two F-box domain-containing proteins (PFL1565c and PFF0960c) were also up-regulated.

As observed in Fig. 4A, the non-UPS genes did not show any statistically significant up-regulation in response to melatonin.

To evaluate whether melatonin-induced UPS transcription modulation could be blocked by luzindole, a melatonin receptor antagonist, [35] we treated parasites with melatonin in the presence of luzindole.

Fig. 4B shows that in the presence of luzindole the UPS transcription modulation no longer occurs in response to melatonin, implying that UPS transcript modulation is involved in melatonin signaling pathway in *P. falciparum* resulting in the changes in the intraerythrocytic stages.

Fig. 5. Melatonin-induced up-regulation of ubiquitin/proteasome system (UPS) gene transcript levels is mediated by PfPK7. The effect of 0.1 μ M melatonin treatment on UPS gene transcript levels observed in wild-type 3D7 parasites (see Fig. 1) was assessed by real-time PCR in *pfpk7*⁻ parasites [clone B9 (A)] and the *pfpk7*-complemented clone B9 (B). The effect of melatonin treatment is abolished in the knockout clone and partially restored in the complemented parasites (PfPK7 – complement) (B). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. The data show the average of at least three independent experiments.

We then assessed whether the increase in UPS transcripts caused by melatonin treatment remains in parasites where PfPK7 is absent (*pfpk7*⁻), as these parasites are unable to respond to melatonin-induced variation in intraerythrocytic stages. We carried out real-time PCR analysis of the *pfpk7*⁻ clone as described above similar to the wild-type parasites (Fig. 5A).

We have observed that the response to 0.1 μ M melatonin in up-regulating the UPS genes was abolished in the absence of PfPK7. In the *pfpk7* complemented clone, however, the effect of the treatment is partially restored: Seven (PFI1_0177, PFL1790w, PFL1565c, PFL1245w, PF14_0025, PFI1085w and PF08_0094) of the eleven genes that are regulated in the wild-type strain were also up-regulated in the complemented strain, while PFC0845c, MAL8P1.23, PFF1445c and PFL0190 remained unaffected. Unexpectedly, PFI1085w, an ubiquitin-like protein, was up-regulated only in PfPK7-complemented parasites.

This data provide us evidence that PfPK7 participates in melatonin-induced UPS up-regulation.

Discussion

Transcription of proteasome genes is activated at the schizont stage in *P. falciparum* [26], suggesting an important role of the UPS in parasites development. This is consistent with the observation that proteasome inhibitors such as MLN-273 and bortezomib block *Plasmodium* development [28, 29]. It is interesting to note that some genes are co-expressed and also co-regulated as it is reported for proteasome genes, motifs as G-rich, CACA and TGTATG occur with positional conservation [36].

Our data shed some interesting light on the mode of action of melatonin in *P. falciparum*. First, treatment with the indoleamine clearly affects the steady-state level of mRNA from selected genes. Also, it remains to be determined whether the process that is affected by melatonin is transcription or RNA degradation (or both). It is important to note that the ability to promote changes in the expression of UPS genes by melatonin also occurs in mammalian cells [37, 38].

Second, the atypical kinase PfPK7 plays a crucial role in the signaling events that connect hormone sensing (whose receptor remains to be identified) to the intraerythrocytic cell cycle modulation as this response is abolished in *pfpk7*⁻ parasites, which is restored in part upon complementation; the fact that restoration is only partial suggests that more than one pathway leading to gene expression control may be involved. It is to be noted that the complemented *pfpk7* is driven by a promoter different from the endogenous one. Third, PfPK7 acts upstream of the calcium rise triggered by hormone treatment, as this rise is diminished in *pfpk7*⁻ parasites and, like UPS mRNA level up-regulation, is restored upon complementation.

The importance of PfPK7 in merozoite production by schizonts underscores its role in cell cycle control in *P. falciparum*. Classical MAPK substrates include regulatory proteins such as cell cycle control proteins and transcription factors. Although PfPK7 share some similarity to MEK, a member of MAP kinases, it has been suggested that MAP kinase signaling does not occur through three-component system (ERK1/2, p38 or JNK MAPKs) in *P. falciparum* [20]. Thus, PfPK7 could modulate the parasite cell cycle in an atypical way from classical MAP kinases.

The classical melatonin receptors in vertebrates are membrane receptors from GPCR family (G-protein coupled receptor) MT1 and MT2 [39]. However, melatonin is not a MT1–MT2 exclusive ligand, but also can bind to nuclear receptors such as retinoic acid receptor family [40], or even to cytosolic proteins such as calmodulin [41].

Although we have not found a melatonin receptor MT1 or MT2 orthologues in *Plasmodium* genome even though luzindole, a competitive melatonin receptor antagonist [35] is able to block melatonin-induced intraerythrocytic cycle modulation in *P. falciparum* [3]. It is possible that in *P. falciparum* receptors binding to melatonin have weak primary sequence homology to MT1 or MT2. Furthermore, the present work demonstrates that melatonin-induced UPS mRNA level up-regulation is blocked by luzindole.

Thus, we identified components of the melatonin response pathway and effectors. This generates a new set of questions that we can now address to complete this emerging picture, such as the modalities of PfPK7 effect on calcium release, the global transcriptional response to melatonin, details of gene expression-regulating mechanisms involved, the ubiquitination targets and the pathway(s) through which UPS gene products mediate cell cycle and synchronization modulation.

Melatonin influences host-parasite relationships by a variety of mechanisms [42]. Disrupting malaria synchrony causes a 50% drop in in-host replication and transmission stages [43]. The importance of synchrony in malaria therapy has been assessed by combining luzindole and chloroquine [44]. Besides, the application of melatonin as a malaria therapeutics has been proposed as melatonin acts as an antioxidant, protecting liver cells from apoptosis caused by sporozoites [45]. In addition, melatonin produced by *Trypanosoma cruzi* affects the differentiation of metacyclic forms [46] and UPS has been implicated in the transformation of trypomastigotes into amastigotes [47].

Acknowledgements

We thank Dominique Dorin-Semblat, Luc Reininger and Christian Doerig (Inserm-EPFL Joint Laboratory, Switzerland) for providing the parasites knockout clones for PfPK7, PfNek-2 and PfNek-3. We thank Fundação de Amparo à pesquisa de São Paulo (FAPESP), INCT-InBqmed and Pronex-Malaria for funding C.R.S.G., F.C.K. and JG received fellowship from FAPESP. RY received CAPES fellowship. D.C. laboratory is funded by a grant from the U.S. National Institutes of Health (AI73795).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- DOERIG C, BAKER D, BILLKER O et al. Signalling in malaria parasites. The MALSIG consortium. *Parasite* 2009; **16**:169–182.
- HOTTA CT, GAZARINI ML, BERALDO FH et al. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol* 2000; **2**:466–468.
- BERALDO FH, GARCIA CR. Products of tryptophan catabolism induce Ca^{2+} release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Pineal Res* 2005; **39**:224–230.
- BUDU A, PERES R, BUENO VB et al. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites. *J Pineal Res* 2007; **42**:261–266.
- BAGNARESI P, ALVES E, DA SILVA EB et al. Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int J Gen Med* 2009; **2**:47–55.
- BERALDO FH, ALMEIDA FM, DA SILVA AM et al. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol* 2005; **170**:551–557.
- HOTTA CT, MARKUS RP, GARCIA CR. Melatonin and N-acetyl-serotonin cross the red blood cell membrane and evoke calcium mobilization in malarial parasites. *Braz J Med Biol Res* 2003; **36**:1583–1587.
- BAKER DA, KELLY JM. Purine nucleotide cyclases in the malaria parasite. *Trends Parasitol* 2004; **20**:227–232.
- CALDAS ML, WASSERMAN M. Cytochemical localisation of calcium ATPase activity during the erythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 2001; **31**:776–782.
- GARCIA CR, DE AZEVEDO MF, WUNDERLICH G et al. *Plasmodium* in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008; **266**:85–156.
- MUHIA DK, SWALES CA, ECKSTEIN-LUDWIG U et al. Multiple splice variants encode a novel adenylyl cyclase of possible plastid origin expressed in the sexual stage of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2003; **278**:20014–20022.
- NAGAMUNE K, SIBLEY LD. Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. *Mol Biol Evol* 2006; **23**:1613–1627.
- ONO T, CABRITA-SANTOS L, LEITAO R et al. Adenylyl cyclase alpha and cAMP signaling mediate *Plasmodium* sporozoite apical regulated exocytosis and hepatocyte infection. *PLoS Pathog* 2008; **4**:e1000008.
- PASSOS AP, GARCIA CR. Characterization of Ca^{2+} transport activity associated with a non-mitochondrial calcium pool in the rodent malaria parasite *P. chabaudi*. *Biochem Mol Biol Int* 1997; **42**:919–925.
- VAID A, THOMAS DC, SHARMA P. Role of Ca^{2+} /calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2008; **283**:5589–5597.
- VAROTTI FP, BERALDO FH, GAZARINI ML et al. *Plasmodium falciparum* malaria parasites display a THG-sensitive Ca^{2+} pool. *Cell Calcium* 2003; **33**:137–144.
- GAZARINI ML, GARCIA CR. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca^{2+} fluctuations. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **321**:138–144.
- KOYAMA FC, CHAKRABARTI D, GARCIA CR. Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol* 2009; **165**:1–7.
- GAZARINI ML, BERALDO FH, ALMEIDA FM et al. Melatonin triggers PKA activation in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *J Pineal Res* 2011; **50**:64–70.
- DORIN D, SEMBLAT JP, POULLET P et al. PfPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2005; **55**:184–196.
- MERCKX A, ECHALIER A, LANGFORD K et al. Structures of *P. falciparum* protein kinase 7 identify an activation motif and leads for inhibitor design. *Structure* 2008; **16**:228–238.
- DORIN-SEMBLAT D, SICARD A, DOERIG C et al. Disruption of the PfPK7 gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* 2008; **7**:279–285.
- REININGER L, TEWARI R, FENNELL C et al. An essential role for the *Plasmodium* Nek-2 Nima-related protein kinase in the sexual development of malaria parasites. *J Biol Chem* 2009; **284**:20858–20868.
- HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**:425–479.

25. CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 1998; **17**:7151–7160.
26. BOZDECH Z, LLINAS M, PULLIAM BL et al. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* 2003; **1**:E5.
27. HORROCKS P, NEWBOLD CI. Intraerythrocytic polyubiquitin expression in *Plasmodium falciparum* is subjected to developmental and heat-shock control. *Mol Biochem Parasitol* 2000; **105**:115–125.
28. LINDENTHAL C, WEICH N, CHIA YS et al. The proteasome inhibitor MLN-273 blocks exoerythrocytic and erythrocytic development of *Plasmodium* parasites. *Parasitology* 2005; **131**:37–44.
29. REYNOLDS JM, EL BISSATI K, BRANDENBURG J et al. Antimalarial activity of the anticancer and proteasome inhibitor bortezomib and its analog ZL3B. *BMC Clin Pharmacol* 2007; **7**:13.
30. TRAGER W, JENSEN JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; **193**:673–675.
31. LAMBROS C, VANDERBERG JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979; **65**:418–420.
32. GARCIA CR, MARKUS RP, MADEIRA L. Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malarial infection. *J Biol Rythms* 2001; **16**:436–443.
33. BRUCE JI, STRAUB SV, YULE DI. Crosstalk between cAMP and Ca²⁺ signaling in non-excitable cells. *Cell Calcium* 2003; **34**:431–444.
34. PONTS N, YANG J, CHUNG DW et al. Deciphering the ubiquitin-mediated pathway in apicomplexan parasites: a potential strategy to interfere with parasite virulence. *PLoS ONE* 2008; **3**:e2386.
35. DUBOCOVICH ML. Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; **246**:902–910.
36. IENGAR P, JOSHI NV. Identification of putative regulatory motifs in the upstream regions of co-expressed functional groups of genes in *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* 2009; **10**:18.
37. CHO JW, KIM CW, LEE KS. Modification of gene expression by melatonin in UVB-irradiated HaCaT keratinocyte cell lines using a cDNA microarray. *Oncol Rep* 2007; **17**:573–577.
38. SUNG JH, CHO EH, KIM MO, et al. Identification of proteins differentially expressed by melatonin treatment in cerebral ischemic injury – a proteomics approach. *J Pineal Res* 2009; **46**:300–306.
39. DUBOCOVICH ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 1995; **16**:50–56.
40. WIESENBERG I, MISSBACH M, CARLBERG C. The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor Neurol Neurosci* 1998; **12**:143–150.
41. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci* 1993; **53**:201–207.
42. BAGNARESI P, NAKABASHI M, THOMAS AP, et al. The role of melatonin in parasite biology. *Mol Biochem Parasitol* 2011; **181**:1–6.
43. O'DONNELL AJ, SCHNEIDER P, MCWATTERS HG, et al. Fitness costs of disrupting circadian rhythms in malaria parasites. *Proc Biol Sci* 2011; **278**:2429–2436.
44. BAGNARESI P, MARKUS RP, HOTTA CT, POZZAN T, GARCIA CRS. Desynchronizing *Plasmodium* cell cycle by a melatonin antagonist: a potential therapeutic target in malaria? *Int J Gen Med* 2008; **2**:55–58.
45. SRINIVASAN V, SPENCE DW, MOSCOVITCH A et al. Malaria: therapeutic implications of melatonin. *J Pineal Res* 2010; **48**:1–8.
46. MACIAS M, RODRIGUEZ-CABEZAS MN, REITER RJ et al. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res* 1999; **27**:86–94.
47. DE DIEGO JL, KATZ JM, MARSHALL P et al. The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry* 2001; **40**:1053–1062.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Distribution of intraerythrocytic stages in response to melatonin.

Table S2. List of genes analyzed by 100 nM melatonin treatment.

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.