

**Robson Sartorello**

**Aspectos de Transdução de  
Sinal em *Plasmodium***

Tese apresentada ao  
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

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina  
da Silva Garcia

SÃO PAULO  
2008

## RESUMO

Sartorello R. Aspectos de transdução de sinal em *Plasmodium* [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

A compreensão de aspectos da biologia do *Plasmodium* é crucial na identificação de novos alvos quimioterápicos. A colina quinase, 1ª enzima de uma via que forma 45% da membrana de *P. falciparum* foi clonada, expressa e purificada, e um anticorpo policlonal desenvolvido para acompanhar sua localização no ciclo intra-eritrocítico. Estudos de transporte da enzima demonstraram que a PfChok é transportada para o citossol por uma via independente de Brefeldina A, um antibiótico inibidor do transporte do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi. Obteve-se também informação da estrutura secundária e uma modelagem da estrutura terciária da proteína, onde foram localizados sítios de fosforilação para proteínas quinases. Através de uma nova abordagem em genômica funcional de *Plasmodium*, o gene da proteína adaptadora PfRACK (Receptor for Activated C Kinase) foi códon otimizado e inserido em células de mamíferos. Estudos de dinâmica de  $Ca^{2+}$  em microscopia confocal indicaram que a sinalização por  $Ca^{2+}$  das células estudadas é inibida na presença de PfRACK, sendo esta dependente da interação direta com receptores de  $IP_3$ . Além disso, a enzima localiza-se distintivamente em relação à RACK1 endógena. Nossos resultados abrem a possibilidade de novos estudos de genômica funcional da malária, ao estabelecer a transfecção de genes do parasita para estudos de mecanismos de transdução de sinal na interação *Plasmodium*-hospedeiro.

Palavras-chave: Malária; Cálcio; Transdução de sinal.

## ABSTRACT

Sartorello R. *Plasmodium*: transduction signal aspects. [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Understanding the basic aspects of *Plasmodium* biology is critical on identification of new drug targets. Choline Kinase, the first enzyme of a pathway responsible for up to 45% of *Plasmodium falciparum* parasite membrane, was cloned, expressed and purified, and a policlonal antibody was developed to follow its localization along the intraerythrocytic cycle.

Transport studies on the enzyme has showed that PfChok is transported to parasite's cytosol, through a pathway independent of the Endoplasmic Reticulum to Golgi apparatus transport inhibitor Brefeldin A. Information about the secondary structure of the enzyme was also obtained, as well a model of the tertiary structure, where several kinases phosphorylation sites were identified.

By using a new approach on functional genomics, the complete PfRACK (Receptor for Activated C Kinase) gene was codon-optimized and transfected in mammalian cells. Dynamic  $Ca^{2+}$  studies by confocal microscope have revealed that  $Ca^{2+}$  signaling of the transfected cells was inhibited by PfRACK. The inhibition seems to be dependent on direct interaction with InsP3 receptors. Also, the protein co-localizes distinctly of the endogenous RACK1 protein. Our results open new possibilities of malaria functional genomics, by establishing the transfection of parasites genes into mammalian cells with the aim to study transduction signals mechanisms of the *Plasmodium*-host interaction.

Keywords: Malaria; Calcium; Signal transduction.

## 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia da malária

Os protozoários do gênero *Plasmodium* são os agentes etiológicos da malária, doença à qual cerca de 40% da população mundial encontra-se exposta. Estes patógenos matam de 1 a 2 milhões de pessoas a cada ano (Organização Mundial de Saúde, 2004), principalmente crianças na África subsaariana (Snow, *et al.*, 2004). A espécie *P. falciparum* causa a mais virulenta forma de malária humana. Os estágios sanguíneos que infectam eritrócitos maduros são responsáveis por todos os sintomas e patologias da doença, e por este motivo é a parte mais estudada do ciclo de vida do *Plasmodium* (Prudêncio, *et al.*, 2006).

Este parasita utiliza em especial a variabilidade genética como estratégia para se evadir do sistema imune do hospedeiro. Por consequência, através de seleção natural, ocorre o desenvolvimento de resistência a medicamentos desenvolvidos após um período variável de alguns anos a algumas décadas. Mesmo após o seqüenciamento da cepa 3D7 do parasita *Plasmodium falciparum* (Gardner, *et al.*, 2002), pouca informação se encontra disponível a respeito das variações fenotípicas e genéticas responsáveis pela virulência e resistência a drogas. Conhecer melhor a biologia básica deste parasita, com o objetivo de identificar novos alvos de intervenção quimioterápica constitui, portanto o grande desafio atual dos estudos de *Plasmodium sp.*

Recentemente, levantamentos sobre dados epidemiológicos da malária no mundo foram objeto de discussão, ao afirmar que o número de casos anuais desta doença se situaria entre 300 e 660 milhões (Snow, *et al.*, 2005), que significa um incremento de pelo menos 200% no número de casos fora da África que o reportado pela Organização Mundial de Saúde em 2004.

Apesar de mais de um século de esforços para erradicar ou controlar a malária, a doença continua sendo um perigo crescente para a saúde pública de países em desenvolvimento nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Um

dos motivos para a dificuldade de combate da doença é o fato do ciclo de vida do *Plasmodium* ser extremamente complexo.

Um esforço internacional foi lançado em 1996 para seqüenciar o genoma do *Plasmodium falciparum*, finalizada em 2002 (Gardner, *et al.*, 2002). A seqüência genômica de seu vetor, o mosquito *Anopheles gambiae* (Holt, 2002) também foi determinada. Com isso, uma enorme gama de possibilidades de estudos se abriu, já que todos os genomas envolvidos no ciclo de desenvolvimento do *Plasmodium falciparum* foram elucidados, iniciando assim a era pós genômica no estudo da malária.

## **1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium***

O parasita da malária exhibe um complexo ciclo de vida que envolve um vetor inseto e um hospedeiro vertebrado (Garcia, *et al.*, 2008).

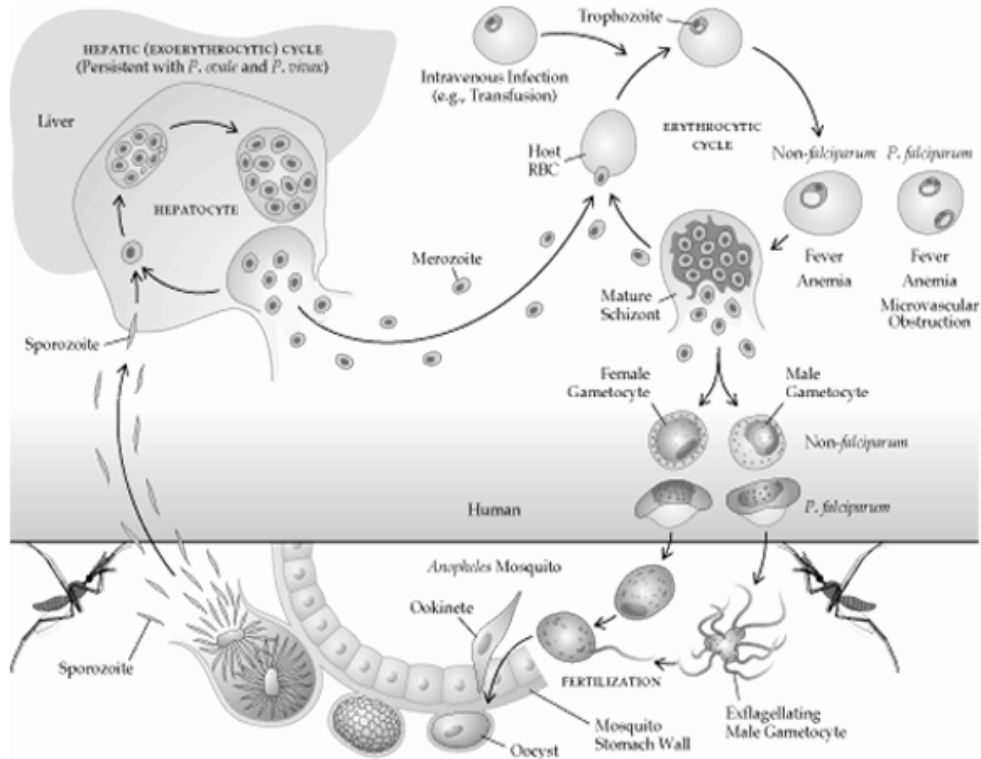
A infecção é iniciada quando esporozoítos presentes na glândula salivar do inseto são injetados juntamente com a saliva do mosquito durante a picada deste no hospedeiro vertebrado (Figura 1). Os esporozoítos são então carregados pelo sistema circulatório até o fígado, onde invadem hepatócitos. Uma vez dentro destas células, o parasita inicia uma replicação assexuada denominada esquizogonia exoeritrocítica. Nesta fase crítica de multiplicação de parasitas, formam-se milhares de merozoítos em cada hepatócito, que são liberados na corrente sanguínea. Nas espécies *P. vivax* e *P. ovale*, uma parte dos parasitas do ciclo hepático permanecem em repouso nos hepatócitos, em uma forma denominada hipnozoítos, que podem se reativar em meses ou até anos após a infecção primária formando merozoítos, tal qual no início da infecção aguda. Embora apenas um pequeno número de esporozoítos seja injetado na corrente sanguínea do hospedeiro durante uma picada do mosquito, esporozoítos podem ser encontrados nos hepatócitos depois de apenas 2 minutos no caso de roedores (Ménard, 2000).

Os estágios de infecção malárica do fígado são considerados clinicamente silenciosos, isto é, não causa uma resposta inflamatória por diversos dias após a infecção, apesar de milhares de merozoítos já estarem presentes nos hepatócitos. Este fato levou ao questionamento sobre quais mecanismos os parasitas utilizam para modular a resposta inflamatória local do hospedeiro.

Os merozoítos invadem eritrócitos e iniciam um período trófico onde o parasita aumenta sua massa. O início do estágio trofozoíto é comumente chamado de estágio anel, devido a razões morfológicas. A progressão do estágio trofozoíto é acompanhada de uma intensa atividade metabólica, incluindo a ingestão do citoplasma da célula hospedeira e a proteólise de hemoglobina em aminoácidos. O final do estágio trofozoíto é marcado pelo início da divisão nuclear, que se repete diversas vezes sem que ocorra citocinese, caracterizando o estágio esquizonte. A partir do esquizonte maduro, desenvolve-se dentro da célula hospedeira, novos merozoítos, que rompem o eritrócito infectado e são liberados na corrente sanguínea. Ao invadir novos eritrócitos, perpetuam o ciclo denominado intra-eritrocítico.

Alternativamente, o merozoíto já dentro do eritrócito pode diferenciar-se em formas sexuadas denominadas de micro e macrogametócitos, que se distinguem morfológicamente dos estágios assexuados por ocupar a quase totalidade do interior do eritrócito. Estas formas do parasita permanecem circulantes na corrente sanguínea do hospedeiro até serem ingeridos pelo mosquito vetor. A ingestão dos gametócitos induz o início do processo denominado gametogênese, onde os gametócitos rompem o eritrócito e se diferenciam, no lúmen do intestino do mosquito em microgametas e macrogametas. O microgameta passa por um processo de exflagelação, e fertiliza o macrogameta, formando o zigoto. O zigoto se desenvolve em um oocineto móvel, que por sua vez invade as células epiteliais do intestino do mosquito e se transforma em um oocisto. Este se replica diversas vezes assexuadamente, resultando na formação de esporozoítos dentro da célula epitelial do intestino do mosquito vetor. A ruptura desta célula libera os

esporozoítos para a hemocele do mosquito, que migram até as suas glândulas salivares, completando o ciclo.



**Figura 1** - Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. No hospedeiro vertebrado, são visíveis os ciclos assexuados, intra-eritrocítico e hepático. No mosquito vetor, o ciclo sexuado (Organização Mundial de Saúde, 2004).

O ciclo de vida dos parasitas *Plasmodium* sp caracteriza-se pela passagem obrigatória e alternada entre o hospedeiros invertebrado, onde ocorre a fase sexuada do ciclo, e vertebrado, onde ocorre a diferenciação de merozoítos em gametócitos que darão origem aos gametas. Dentro dos hospedeiros ocorre obrigatoriamente a infecção de novas células com o objetivo de produzir a próxima geração de estágios, que possuem por sua vez, a capacidade de invadir novas células. Por serem considerados eventos críticos na sobrevivência do parasita, estes processos de invasão são estudados em laboratórios de todo o mundo, com o objetivo de identificar novos alvos quimioterápicos.



### 1.3 Mudança climática

Ectotermos, como os mosquitos vetores da malária, constituem a vasta maioria da biodiversidade animal encontrada no planeta. São especialmente vulneráveis ao aquecimento do clima, porque suas funções fisiológicas principais como locomoção, crescimento e reprodução são fortemente influenciados pela temperatura do ambiente. A habilidade de ectotermos de desempenhar funções em diferentes temperaturas é descrita por uma curva de desempenho, que aumenta gradualmente a partir de uma temperatura mínima crítica, até uma temperatura ótima, caindo rapidamente a uma temperatura máxima letal (Deutsch, *et al.*, 2008).

Doenças derivadas de mosquito, como o caso da malária, são, portanto extremamente sensíveis a condições de clima. De fato, nos últimos 35 anos, o número de casos de malária no mundo aumentou em 200 a 300%. Desde a década de 1970, o globo se aquece a uma taxa constante de 0,2 °C por década (Patz, 2005). A elevação no número de casos anuais de infecção por *Plasmodium* tem como responsável uma soma de fatores, mas as mudanças climáticas globais não podem ser desprezadas nesse processo (Hartl, 2004), principalmente por serem consideradas irreversíveis. É postulado que no futuro a rampa de ascensão de temperatura média do planeta observada nos últimos 40 anos irá se acentuar (IPCC, 2002).

Torna-se importante determinar como a mudança climática afetará o mapa de endemia da malária. Poucos trabalhos quantitativos foram desenvolvidos a esse respeito, e a correlação entre a mudança de temperatura global observada e a elevação no número de casos de malária registrados no mesmo período não pôde ser estabelecida. Há, porém um debate científico a respeito do papel da mudança climática em recentes emergências de doenças derivadas de vetor, para as quais a relação com a mudança de temperatura se demonstrou patente, como por exemplo, a recente redistribuição global do mosquito *Aedes albopictus*, um dos mosquitos responsáveis pela transmissão da dengue (Roiz, *et al.*, 2008).

Evidências principalmente laboratoriais, a respeito da sensibilidade de patógenos e vetores a condições do ambiente sugerem que a mudança climática, em particular a tendência de aumento global de temperatura, é potencialmente capaz de atuar em indivíduos e nas características genéticas de populações ao longo do tempo. A respeito da transmissão de patógenos, parâmetros importantes a serem investigados são as mudanças nas taxas de sobrevivência e reprodução, o que determina sua distribuição e abundância; intensidade e padrão temporal da atividade do vetor, em particular a taxa de picadas ao longo do ano; e a taxa de desenvolvimento, sobrevivência e reprodução dos patógenos dentro de seus vetores.

#### **1.4 Desenvolvimento de vacinas**

Esforços em controlar a malária têm sido frustrados pela biologia complexa do parasita e de seus vetores invertebrados, a existência de linhagens resistentes às drogas disponíveis (Mulenga, *et al.*, 2005), bem como estratégias sofisticadas de evasão do sistema imune durante o estágio intra-eritrocítico. Nesse sentido, os estágios iniciais do ciclo de vida do *Plasmodium*, que ocorrem no fígado, são considerados os alvos mais promissores para o desenvolvimento de vacinas e também alvos estratégicos de desenvolvimento de drogas profiláticas, pelo fato do número de parasitas neste estágio da infecção ser baixo, já que cada picada do mosquito infectado transmite um número de parasitas não superiores a 18-123 cópias ao hospedeiro vertebrado (Medica, *et al.*, 2005).

A inativação de esporozoítos de *Plasmodium berguei* por raios X e radiação  $\gamma$  por Nussenzweig em 1967 demonstrou pela primeira vez a possibilidade de imunidade induzida em um modelo de malária. Em humanos, a administração de esporozoítos atenuados levou à proteção completa em voluntários (revisão em Hoffman, 2002). Porém, a necessidade de cerca de 1000 esporozoítos por imunização torna o procedimento inviável. A atual pesquisa se concentra no

desenvolvimento de uma vacina a partir de proteínas do esporozoítio, que seriam capazes de promover de forma reprodutível o efeito demonstrado a partir dos esporozoítios atenuados.

Investigações nesse sentido rapidamente levaram à identificação de um antígeno majoritário na superfície do esporozoítio, denominada proteína circunsporozoíta (CS). Vacinas experimentais baseadas na CS foram testadas em humanos, promovendo baixa proteção (Ballou, 1987), mas a clonagem da CS levou à posterior identificação de um polipeptídeo denominado RT, que em conjunto com um antígeno do vírus da hepatite B associado ao adjuvante AS02 (Stoute, *et al.*, 1997), deram origem ao candidato à vacina antimalárica mais promissora até então, atualmente na 2ª fase clínica, tendo sido capaz de conferir imunização significativa e segurança em adultos sem infecção prévia (Stoute, *et al.*, 2007).

## 1.5 Desenvolvimento de novos quimioterápicos

Durante o século XX, a partir dos anos 1940, o tratamento para a malária consistiu em uma monoterapia com a administração de cloroquina, uma 4-aminoquinolina previamente caracterizada pela sua eficácia, baixa toxicidade e baixo custo (Berry, *et al.*, 2006). A cloroquina se liga ao ambiente rico em grupo heme dentro do eritrócito infectado, interferindo no processo de detoxificação do parasita, levando a uma rápida remoção dos parasitas circulantes (Pagola, 2000). Porém, o uso massivo de cloroquina em todo o mundo gerou na década de 1950 os primeiros parasitas resistentes a esta terapia. Apesar da prevalência da resistência à cloroquina, esta droga continua sendo extensamente utilizada, devido a seu custo reduzido e disponibilidade nos países afetados. Juntamente à cloroquina, o artesunato, o antifolato e a mefloquina constituem-se nas únicas alternativas de tratamento da malária a custo baixo, porém da mesma forma, cepas resistentes de *P. falciparum* se desenvolvem rapidamente, e contribuem

pelas atuais taxas inaceitáveis de falha de tratamento da malária na Ásia e África subsaariana (Plowe, 2005).

Com o objetivo de combater a malária, novas drogas são urgentemente necessárias. Mecanismos de desenvolvimento tradicionais resultaram em um número reduzido de medicamentos para tratar a doença (Fidock, *et al.*, 2004). Estas abordagens incluem a otimização da eficácia de drogas existentes, através da adoção de novos protocolos e formulações, desenvolvimento de análogos de drogas existentes, identificação de agentes de reversão de resistência, análise de compostos de produtos naturais, utilização de combinação de quimioterapias existentes (por exemplo, a associação entre mefloquina e artesunato, desenvolvida pela Fiocruz no Rio de Janeiro, considerado único medicamento desenvolvido no Brasil para a malária), e exploração de drogas desenvolvidas para outros fins. O surgimento de parasitas resistentes às drogas atualmente disponíveis torna, portanto cada vez mais desafiador os esforços para a descoberta de novos quimioterápicos. Abordagens modernas, que lancem mão de técnicas de biologia molecular contribuem de maneira crescente na composição do cabedal de ferramentas disponíveis para a identificação de novos alvos para o desenvolvimento de antimaláricos.

Alvos em potencial podem ser relacionados à disfunção de organelas específicas do parasita e suas características inerentes. De interesse particular são a membrana, o vacúolo alimentar, o apicoplasto e a mitocôndria do *Plasmodium*. Esta última organela, por exemplo, por ser desprovida de crista possui capacidade de transporte de elétrons limitada, embora sejam sensíveis às alterações no ambiente iônico do citossol do parasita (Gazarini e Garcia, 2003). Além destas, vias de metabolismo e sinalizações celulares podem ser consideradas de relevância para o mesmo propósito.

Inibidores promissores que atacam a membrana do parasita têm sido desenvolvidos, como o G-25, inibidor do transporte de colina da via de síntese de fosfatidilcolina (Wengelnik, 2002) e inibidores de canais de transporte de membrana exclusivos do parasita.

## 1.6 Transporte em malária

A decisão evolutiva de habitar eritrócitos impôs ao parasita humano *Plasmodium falciparum* várias dificuldades. Inicialmente, o parasita se encontra vulnerável pelos mecanismos de “clearance esplênico”, que remove de circulação eritrócitos senescentes e infectados (Craig e Scherf, 2001). O parasita também necessita trazer do plasma sanguíneo uma série de nutrientes, como glicose, o substrato energético chave para o parasita, vitamina B5, precursora da coenzima A, importante cofator enzimático, e colina, o precursor do fosfolípido fosfatidilcolina, componente de membrana essencial do parasita (Kirk e Saliba, 2007) uma vez que eritrócitos são células altamente especializadas e anucleadas, nas quais muitos transportadores de nutrientes estão ausentes. De modo à transpor estes problemas, o parasita modifica radicalmente às propriedades de sua célula hospedeira, ao inserir proteínas que criam novas vias de permeabilidade ou que estão envolvidas na evasão do sistema imune (Kirk, 2004).

Nas células eucarióticas, em um dos caminhos das proteínas a serem secretadas, elas são direcionadas ao lúmen do retículo endoplasmático, e então transportadas por vesículas, muitas vezes via o complexo de Golgi, até a superfície da célula, onde são finalmente liberadas (revisado por Kirchhausen, 2000). As proteínas exportadas por *Plasmodium*, porém, precisam seguir uma via mais complexa. Após cruzar sua própria membrana citoplasmática, as proteínas passam o vacúolo parasitóforo, que separa o parasita da célula hospedeira, passam para o citoplasma do eritrócito e então são finalmente inseridas na membrana da célula hospedeira. O parasita deve resolver o problema do transporte de proteínas sozinho, já que eritrócitos não contêm a maquinaria secretória encontrada em outras células eucarióticas. Evidências crescentes indicam que as estruturas de origem do parasita, denominadas Fendas de Maurer, desempenham um papel crucial como um compartimento intermediário no transporte de proteínas através do citoplasma da célula hospedeira para a membrana do eritrócito infectado (Lanzer, *et al.*, 2006).

As fendas de Maurer surgem em estágios iniciais do trofozoíto e permanecem até o restante do ciclo intra-eritrocítico. Há a hipótese que o destino final das fendas de Maurer seja a justaposição com o citoesqueleto de membrana do eritrócito infectado, pois há evidências de interações com actina e outras proteínas desta estrutura (Blisnick, *et al.*, 2005), e que esta se conecta diretamente com o citoesqueleto, promovendo uma saída para proteínas do interesse do parasita.

Devido ao fato que a maior parte dos protozoários do filo Apicomplexa residem e se desenvolverem no citoplasma da célula parasitada, complexos mecanismos de tráfego de proteínas na interface entre o parasita e as células hospedeiras foram selecionados pela evolução. Como muitas vezes estas vias de secreção se processam de maneira exclusiva nestes parasitas, se tornam interessantes alvos de interferência, e por esse motivo têm recebido grande atenção em estudos recentes. Foram propostos até o momento ao menos 12 diferentes destinos secretórios para *Plasmodium* (Tonkin, *et al.*, 2006b). Peptídeos sinal canônicos para a secreção de proteínas, têm sido identificados para proteínas como, por exemplo, rab GTPases pertencentes à superfamília Ras de proteínas G monoméricas (Wennerberg, *et al.*, 2005) em um grande número de proteínas secretadas pelo *Plasmodium* que são direcionadas para o citossol do eritrócito, o apicoplasto do parasita, o vacúolo alimentar e as fendas de Maurer (Langsley, *et al.*, 2008). Muitos dos processos secretórios descritos são inibidos pelo antibiótico Brefeldina A, um antibiótico inibidor do transporte do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi, indicando que ocorre um processamento nesta organela (Nebenführ, *et al.*, 2002). Outras proteínas seguem um caminho extra-Golgi, como no caso de proteínas direcionadas para o apicoplasto, já que a Brefeldina A não é capaz de interferir neste direcionamento (Tonkin, *et al.*, 2006b).

Grande parte da morbidez da malária é devida tanto a maior aderência da superfície do eritrócito infectado, quanto à rigidez adquirida do seu citoesqueleto

que resultam em obstrução de capilares sanguíneos, levando a hemorragia no cérebro, que caracteriza a malária cerebral, e na placenta, na malária materna. Ocasionalmente também o seqüestro destes eritrócitos no sistema vascular periférico, o que impede o clearance pelo baço do hospedeiro destas células infectadas e contribui para a perpetuação da infecção (Bonney e Ménard, 2008). Ambas as modificações do eritrócito infectado ocorrem devido à exportação de cerca de 80 proteínas do parasita, constituindo uma nova maquinaria que é estabelecida pelo protozoário no interior da célula parasitada (Maier, *et al.*, 2008). Proteínas secretadas pelo parasita que possuem variação em sua composição, seja por variação subtelomérica, como no caso da STEVOR (subtelomeric variant open reading frame) ou repetições recombinantes, por exemplo, PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1), são as responsáveis por mudanças antigênicas e de adesividade do eritrócito infectado. A PfEMP1 é considerada a proteína que promove a maior virulência observada na malária cerebral e malária de placenta (Sherman, 2003).

Os parasitas da malária circulam na corrente sanguínea humana em repetidos ciclos de invasão e desenvolvimento dentro do eritrócito humano. No caso de *P. falciparum*, durante um período de 48 horas, os parasitas endocitam de 80 a 90% do citossol da célula hospedeira e a hemoglobina (Pandey, *et al.*, 2004). Proteases especializadas trafegam até as vesículas que contêm a hemoglobina e iniciam a digestão da mesma, enquanto esta se transluz em última instância até o compartimento lisossomal ou vacúolo alimentar (Klemba e Goldberg, 2005). Apesar de este processo endocítico ser caracterizado por estruturas do parasita morfológicamente distintas, incluindo estruturas para a tomada de hemoglobina (citossomos), vesículas que contêm a mesma, e um compartimento alimentar único, a contribuição de componentes protéicos para a via endocítica requerida para o transporte de membrana, a sinalização molecular das proteínas que irão efetuar tal recrutamento e posterior formação são objeto de pesquisa atual (Binder e Kim, 2004).

O estudo de transportadores, por sua vez, recebe atenção pelo fato de serem relacionados à aquisição de resistência por parte do parasita da malária, em particular às quinolinas (cloroquina, quinino e mefloquina), agentes largamente utilizados na terapia antimalárica. Embora o mecanismo de ação das quinolinas não tenha sido determinado, é sabido que ocorre acúmulo destas drogas de maneira diferencial em cepas de *Plasmodium* resistentes, e estudos genéticos determinaram polimorfismos em transportadores localizados na membrana do vacúolo digestivo destas cepas, que confeririam uma maior capacidade de efluxo destas drogas, contribuindo para a resistência (Henry, *et al.*, 2008). Inibidores destes transportadores são desenvolvidos atualmente com o intuito de agir como um agente de reversão de resistência às quinolinas, em uma terapia combinada.

## **1.7 Estudos de função gênica por variação fenotípica em *Plasmodium***

Várias linhagens *knockout* para diferentes espécies de *Plasmodium* têm sido desenvolvidas nos últimos anos, com o objetivo de observar mudanças fenotípicas resultantes da deleção de genes e assim estudar sua função. Como exemplo temos o *knockout* de proteínas como a PfEMP3 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3), cuja deleção bloqueia a transferência da PfEMP1 para o exterior da membrana do eritrócito infectado (Waterkeyn, 2000, revisão em Garcia, *et al.*, 2008); a PbCHt1, que quando ausente reduz a infectividade em *Anopheles stephensi* (Dessens, *et al.*, 2001); as proteínas PfPM1 e IV, PfPMII, PfHAP PfP-2, cujas deleções resultam em diminuição na taxa de crescimento do parasita (Omara-opyene, *et al.*, 2004; Liu, *et al.*, 2006) e as proteínas PbIMC1a, MAEBL, PyTRAP, PkCSP e PbCSP, cujas deleções resultaram como fenótipo diferencial o interrupção da mobilidade e capacidade de invasão de esporozoítos (Sultan, *et al.*, 1997; Kariu, *et al.*, 2002; Mota, *et al.*, 2001;



Kocken, *et al.*, 2002). As plasmepsinas, proteases aspárticas envolvidas no catabolismo de hemoglobina têm sido estudadas como alvo quimioterápico através desta tecnologia (Liu, *et al.*, 2005).

Estudos de *knockouts* de genes de modelos de hospedeiros como o camundongo, têm sido também desenvolvidos com o objetivo de mimetizar aspectos que levam a uma menor suscetibilidade da infecção em humanos. Até o momento foi identificado um gene, o PKLR269A, no genoma murino, que media a resposta do hospedeiro à infecção. Este gene codifica a enzima piruvato quinase, e sua depleção conferiram resistência à infecção malárica (Min-Oo, *et al.*, 2003).

## 1.8 Interferência de RNA

O silenciamento de genes após a transdução ou interferência de RNA (RNA *interference*, RNAi) demonstrada originalmente existir apenas em alguns organismos, têm sido agora observada em organismos diversos ao longo da evolução. É atualmente um dos métodos mais utilizados para o estudo de função de genes em mamíferos. Foi observado que o uso de RNA dupla fita (dsRNA) causam uma redução mais drástica da expressão gênica do que o uso de apenas seqüências senso ou anti-senso (Wojcik, 2005).

Estudos subseqüentes utilizando sistemas *in vitro* elucidaram alguns dos aspectos mecanísticos do RNAi: RNAs dupla fita longos são processados por uma ribonuclease específica em dsRNAs de curta extensão, que contém um apêndice de dois nucleotídeos posicionados a 30' e um fosfato 5'. (Ketting, *et al.*, 2001). Estas seqüências dsRNA de curta extensão, chamados de *short interfering* RNA, siRNA, por sua vez se associa com o complexo de silenciamento RNA induzido (RISC), que guia o siRNA ao seu alvo mRNA através de interações de pareamento de bases (Hammond, *et al.*, 2001). Uma vez que o siRNA se encontra associado ao mRNA alvo, nucleases clivam o mRNA (Tuschl, *et al.*, 1999). Uma

melhor compreensão do mecanismo do RNAi levou a avanços que permitem atualmente sua utilização em células de mamíferos (Elbashir, *et al.*, 2001).

O RNAi foi descoberto acidentalmente em *Trypanosoma brucei* no laboratório da Profa Elisabetta Ullu (Ngo, *et al.*, 1998). A partir desta descoberta inicial, iniciou-se uma procura por esta maquinaria em diversos parasitas protozoários. Foi rapidamente reportado no mesmo ano que *C. elegans* também possuía a maquinaria específica para promover a degradação de mRNA exposta aos homólogos dsRNA (Fire, *et al.*, 1998). Apesar deste início animador, trabalhos posteriores demonstraram que nem todos os protozoários possuem esta maquinaria completa. Espécies do mesmo gênero podem ter perdido esta característica ao longo da evolução, como é o caso de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major* (Zhang e Matlashewski, 2000; Robinson e Beverley, 2003; DaRocha, *et al.*, 2004). Os eventos de perda de esta maquinaria não exclusivos de protozoários, já que *S. cerevisiae* também não a possui, embora outros fungos como *S. pombe* sim (Catalanotto, *et al.*, 2000). Em *Toxoplasma gondii*, há um relato que o sistema RNAi se encontra funcional (Al-Anouti e Ananvoranich, 2002).

Se as espécies de *Plasmodium* possuem o sistema RNAi é ainda um assunto em discussão. Apesar de ter sido reportado o silenciamento, com diminuição da atividade da enzima diidrorato desidrogenase (DHODH), responsável pela síntese de pirimidina (McRobert e McConkey, 2002), análises posteriores por *Northern Blotting* não deram suporte à idéia que o gene da DHODH tenha sofrido interferência por RNA. Outros trabalhos reportam o silenciamento da falcipaina 1 e 2 (Malhotra, *et al.*, 2002), de uma cisteína protease em *P. berguei* (Mohammed, *et al.*, 2003), porém também de resultados inconclusivos. Na análise dos genomas de todas as espécies de *Plasmodium* disponíveis também não foi possível identificar moléculas da maquinaria clássica de RNAi, como as enzimas Dicer, Piwi, PAZ e RdRp (Ullu, *et al.*, 2004).

## 1.9 Fisiologia Celular do *Plasmodium*: fosforilação como sinalizador

Mecanismos de fosforilação reversível regulam vários aspectos celulares, desde a base molecular da embriogênese ao funcionamento do cérebro. Fosforilação e defosforilação catalisada por proteínas quinases e fosfatases podem modificar a função de uma proteína de várias maneiras: aumentando ou diminuindo sua atividade biológica; estabilizando-a ou marcando-a para destruição; facilitando ou inibindo o movimento entre compartimentos subcelulares e iniciando ou finalizando a interação entre proteínas. A reversibilidade e a flexibilidade do processo em si tornam a fosforilação o principal regulador em praticamente todas as células eucarióticas.

Os fosfolipídios são os maiores constituintes das membranas, desempenhando diversas funções na atividade celular, a saber: como uma barreira, com o intuito de manter as condições fisiológicas de compartimentos intra e subcelulares (Mayer, *et al.*, 1986); uma matriz para dar suporte a proteínas funcionais da membrana (Singer, 2004), e um precursor da transdução de sinal (Nishizuka, 1992; Exton, 1990).

Além de conter seqüências necessárias para a formação da estrutura tridimensional, muitas proteínas possuem motivos que permitem modificações pós-tradução que modulam sua função, sendo as proteínas quinases o maior grupo de enzimas que realizam essa tarefa transferindo fosfato do ATP para grupos hidroxila específicos em proteínas substrato (Manning e Cantley, 2002). As proteínas quinases em média possuem *in vivo* 20 substratos de fosforilação, e perfazem no caso do genoma humano cerca de 2% dos produtos gênicos (Knebel, 2001).

A utilização de uma quinase como um alvo para o desenvolvimento de drogas requer o reconhecimento que esta é essencial para o desenvolvimento do

parasita ou sua diferenciação, além de mostrar-se distinguível da correspondente do hospedeiro.

Recentemente, várias proteínas quinases pertencentes à superfamília das serinas, treoninas e tirosinas quinases têm sido isoladas no parasita da malária, clonadas e caracterizadas, incluindo as famílias ciclino-dependentes, as ativadas por mitose,  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulina, quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , e a dependente de AMPc (Kappes, *et al.*, 1999).

Na última década, várias drogas foram desenvolvidas utilizando a informação da estrutura tridimensional de proteínas com alvo de proteases, quinases e um número cada vez maior de macromoléculas. Em particular, a estrutura tridimensional de diversas quinases de uma gama de organismos já foi determinada. Por tratar-se em diversos casos de proteínas relativamente pequenas e solúveis, este tipo de estudo tem sido facilitado. A uroquinase (Hajduk, *et al.*, 2000), abl quinase (Schindler, 2000), quinases dependentes de ciclina CDK1, (Furet, *et al.*, 2000); |CDK4 (Honma, *et al.*, 2001) e Lck quinase (Zhu, *et al.*, 1999) e colina quinase (Rodriguez-Gonzalez, *et al.*, 2003) são alguns exemplos de proteínas quinases para as quais foram desenvolvidos inibidores com objetivo principalmente quimioterápico para câncer. Embora recente essa abordagem se mostre bastante promissora na obtenção de novos inibidores efetivos e específicos no combate as mais diversas moléstias.

A colina quinase é uma enzima citossólica em células de mamíferos e está presente em diversos tecidos. Ela catalisa a fosforilação da colina para formar fosforilcolina, na presença de ATP e  $\text{Mg}^{2+}$ , sendo importante na geração de dois dos principais fosfolipídios de membrana, a fosfatidilcolina e a esfingomiéline, e posterior divisão celular. A colina quinase desempenha um papel fundamental em vias de sinalização celular e regulação de crescimento celular no processo de transformação maligna através de oncogenes Ras em diferentes tipos de câncer como de mama, pulmão, cólon, próstata, neuroblastoma, linfomas hepáticos e meningiomas (Janardhan, 2006).

### 1.10 Via *de novo* Kennedy: Colina quinase

O recente interesse na utilização de inibidores das proteínas quinases como possíveis alvos de intervenções quimioterápicas para diversas doenças como câncer, a exemplo da colina quinase (Lacal, *et al.*, 2001) e desordens neurodegenerativas, como por exemplo, a PKC (Battani, *et al.*, 2005), estimularam a pesquisa com o objetivo de determinar quais enzimas pertencentes a esta classe seriam consideradas também alvos para combater doenças causadas por protistas (Doerig, *et al.*, 2005). A idéia é reforçada pelo fato destas proteínas de seres unicelulares guardarem uma vasta distância filogenética em relação às ortólogas que são encontradas nos hospedeiros vertebrados, em especial humanos. Esta distância filogenética se traduz em diferença na estrutura das proteínas, viabilizando o desenvolvimento de inibidores específicos para as enzimas dos parasitas, minimizando efeitos tóxicos nas células do hospedeiro.

A partir dos dados do genoma seqüenciado do parasita *Plasmodium falciparum*, dois grupos independentes, Ward, *et al.* e Anamika, *et al.*, publicaram em 2004 e 2005 as enzimas identificadas com domínios quinase, tendo sido encontradas 65 e 99 proteínas, respectivamente. Surpreendentemente, enzimas consideradas canônicas não foram identificadas nestas análises, entre elas a proteína quinase C (PKC), tirosina quinase ligada a receptor, MAPKK, embora a MAPK tenha sido identificada. O *Plasmodium* seria o único organismo em que estes módulos de MAPK não foram encontradas, o que na realidade demonstra a dificuldade de se inferir a ausência de proteínas no genoma de *Plasmodium*, baseando-se apenas em análises de homologia.

Após a infecção pelo *Plasmodium*, o conteúdo fosfolipídico de eritrócitos de mamíferos aumenta até 500%. A fosfatidilcolina, que representa aproximadamente 45% do total de fosfolipídios, é o principal fosfolipídio na célula parasitada. (Holz, 1977; Sherman, 1979). A biosíntese de fosfatidilcolina ocorre no parasita através

de duas vias: a via *de novo* Kennedy, a partir de colina, e a via Bremer, através da metilação da fosfatidiletanolamina (Vial, 1982).

Em adição ao seu papel estrutural, a hidrólise da fosfatidilcolina pela fosfolipase C e D (Jenkins, 2005) constitui-se na principal fonte de diacilglicerol (DAG), sendo considerada uma importante fonte de moléculas de transdução de sinal (Exton, 1994; Billa, 1990) agonista-induzidas por proteínas G, proteína quinase C (PKC),  $Ca^{2+}$  e tirosina quinases (Exton, 1990). Ainda mais, a síntese *de novo* de fosfatidilcolina é essencial no desenvolvimento normal da célula, particularmente no progresso da fase G1 para a fase S do ciclo celular, onde o balanço entre sua síntese e degradação é controlado (Jackowski, 1994).

A via *de novo* Kennedy parece ser um passo essencial e estratégico no ciclo de vida do parasita, uma vez que sua inibição por compostos quartanários de amônio é letal ao parasita e poderia levar a uma nova abordagem quimioterapêutica para a malária. Sua existência no parasita da malária foi demonstrada pela primeira vez por Ancelin e Henri em 1986, a partir de estudos enzimáticos envolvendo a primeira enzima da via, a colina quinase. A enzima colina quinase foi identificada em diversos organismos entre os quais *Plasmodium falciparum* (Ancelin e Vial, 1986).

O BLAST realizado comparando-se a seqüência de aminoácidos entre as enzimas humana (gi\_4557455) e do *Plasmodium falciparum* linhagem 3D7 (gi\_23509241) revelou uma baixa identidade, de 27% entre ambas, o que possibilitaria uma possível abordagem quimioterapêutica que envolvesse a inativação da colina quinase do parasita da malária, sem contudo interferir de forma contundente no metabolismo de fosfolípidios das células não infectadas do hospedeiro.

Nossa compreensão em integração de sinalização ainda é incompleta. A identificação de substratos-chaves de proteínas quinases, bem como o entendimento de como a fosforilação contribui para as mudanças na fisiologia da célula evocada por determinados sinais, são questões fundamentais em aberto. Dessa forma, o conhecimento de inibidores específicos de proteína quinases para tratamento de doenças constitui um dos objetivos prioritários em indústrias

farmacêuticas para o desenvolvimento de drogas que modulem a atividade de proteínas quinases.

A partir da obtenção da estrutura tridimensional da enzima colina quinase, inibidores específicos poderiam ser desenhados para bloquear o ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*.

### **1.11 Proteínas Adaptadoras - RACK (Receptor for Activated C Kinase)**

Durante os últimos anos tem sido demonstrado que a regulação temporal e espacial da transdução de sinal é muitas vezes obtida a partir da translocação de enzimas, de sua própria via ou de diferentes vias de sinal em grande proximidade, dentro de complexos sinalizatórios (Burack e Shaw, 2000). A ligação de enzimas sinalizatórias a estes complexos é frequentemente dependente de estimulação celular, e é mediada por proteínas que são coletivamente denominadas proteínas adaptadoras ou adaptadores. Adaptadores são usualmente desprovidos de atividade catalítica, mas contém ao menos 2 domínios que mediam interações proteína-proteína. Adaptadores podem se conectar entre uma enzima sinalizatória e uma organela em particular ou em um sítio dentro da célula. Neste caso os adaptadores ancoram a enzima sinalizatória em um determinado estado, próximo a um substrato ou longe de enzimas com funções opostas (Schechtman e Mochly-Rosen, 2001).

Adaptadores podem concomitantemente se ligar a diversas enzimas sinalizatórias. Se as enzimas modulam a função uma das outras, a ligação de ambas as enzimas a um adaptador se torna um modo efetivo de se obter diferentes efeitos na transdução do sinal. Esta transdução de sinal contexto-dependente é um modo essencial pelo qual as células decodificam múltiplos estímulos (Burack e Shaw, 2000). Portanto, elucidar a natureza molecular da

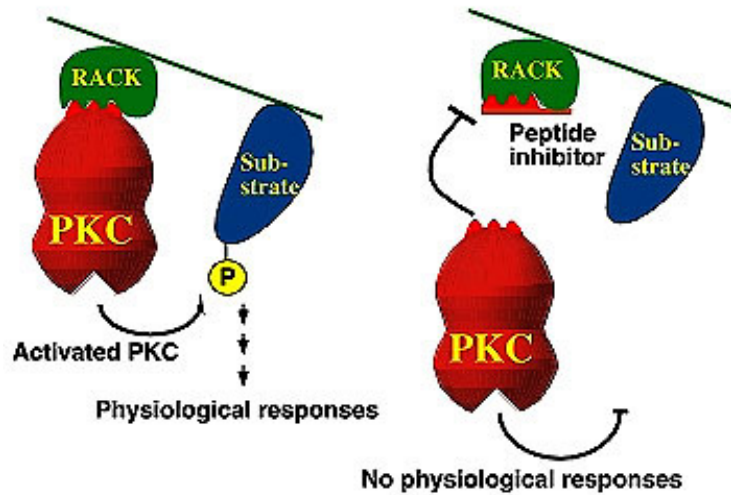
interação de cada proteína sinalizatória com seus adaptadores é requerido para a compreensão de vias de transdução de sinal e as respostas das células a estímulos únicos e múltiplos.

Foram descritas até o momento 10 diferentes isozimas da proteína quinase C (PKC), que podem ser divididas em três subfamílias, de acordo com a sua sensibilidade a segundo mensageiros, ( $\text{Ca}^{2+}$  e diacilglicerol - DAG), ou a PMA (forbol-12-miristato-13-acetato). As isozimas PKC clássicas ( $\alpha$ ,  $\beta_I$ ,  $\beta_{II}$ , e  $\gamma$ ) são sensíveis a ambos segundo mensageiros e a PMA. As novas PKCs descritas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , e  $\theta$ ) são ativadas na presença de DAG e PMA. As isozimas PKC denominadas atípicas ( $\mu$ ,  $\nu$ ,  $\xi$ ,  $\zeta$  e  $\iota$  /  $\lambda$ ) dependem de lipídios, mas não são ativas por DAG,  $\text{Ca}^{2+}$  ou PMA (Mellor e Parker, 1998; Nishizuka, 1988).

Apesar das homologias encontradas entre as diferentes isozimas, cada PKC media funções celulares únicas (Dempsey, *et al.*, 2000; Parker e Murray-Rust, 2004), determinadas pelo substrato que fosforilam.

As proteínas RACK (*receptor for activated C kinase*) são proteínas que ancoram a proteína quinase C (PKC) em seu local de translocação, onde a PKC pode regular muitas funções celulares pela fosforilação de proteínas-alvo. A ligação da RACK estabiliza a PKC em sua forma ativa e aumenta a fosforilação do substrato (Figura 2), apesar da RACK por si não apresentar atividade enzimática (Ron, *et al.*, 1994). Devido à organização espacial e temporal de complexos sinalizatórios que as proteínas RACK promovem, a velocidade e a precisão de eventos sinalizatórios podem ser moduladas finamente em resposta a diferentes estímulos (Schechtman, *et al.*, 2001).





**Figura 2** – A proteína RACK ancora a proteína quinase C após a sua ativação, facilitando a fosforilação do substrato. Na presença de um inibidor da RACK, as respostas fisiológicas que seriam promovidas pela PKC se encontram inibidas (Modificado de Souroujoun e Mochly-Rosen, 1998).

A diminuição da expressão de RACK em neurônios está relacionada com o envelhecimento fisiopatológico do cérebro na doença de Alzheimer (Battani, *et al.*, 2005), e o aumento da atividade da RACK é relacionado com a desordem afetiva bipolar (Wang e Friedman, 2001). Recentemente, Snyder e colaboradores reportaram que a RACK se liga a receptores de inositol-1, 4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e modula a sinalização por cálcio (Patterson, *et al.*, 2004).

Através de análise de expressão gênica em parasitas induzidos a apoptose, Welburn e Murphy em 1998 postularam que proteínas ortólogas da RACK em espécies de tripanossomos desempenham funções no controle da divisão celular, incluindo apoptose de protozoários (Welburn e Murphy, 1998). Foi reportado por nosso grupo que *Plasmodium falciparum* expressa uma ortóloga da RACK1, nomeada PfRACK (Madeira, *et al.*, 2003). Esta proteína foi demonstrada como sendo constitutivamente expressa ao longo do ciclo intra-eritrocítico e esporozoítos, e possivelmente exportada para a superfície do eritrócito infectado

(Lanzer, *et al.*, 2006), sendo considerada um alvo para o desenvolvimento de drogas antimaláricas.

A análise proteômica de fendas de Maurer realizada por Vincisini, *et al.* em 2005 identificou proteínas homólogas relacionadas a vias de sinalização celular. Entre estas, foi identificada a homóloga da RACK (receptor for activated C kinase) em *P. falciparum*. A PfRACK foi publicada como constitutivamente expressa no estágio assexuado do ciclo de vida do *P. falciparum* (Madeira, *et al.*, 2003) contendo 2 domínios conservados importantes para a ligação com a proteína quinase C (PKC). Adicionalmente, dados do PlasmoDB de espectrometria de massa e Lanzer, *et al.*, 2006 posteriormente demonstraram que a proteína pode estar presente também na superfície do eritrócito infectado, além do esporozoíto e gametócito. Limitações da técnica utilizada na época podem ter dificultado a detecção da proteína, apesar do anticorpo policlonal ter reconhecido a PfRACK de maneira seletiva.

A proteína PKC não foi identificada no genoma de *P. falciparum* até o momento, o que leva à questão se PfRACK desempenharia outras funções no parasita. A habilidade deste em manipular a sinalização de  $Ca^{2+}$  da célula hospedeira poderia conferir o controle de diversas funções celulares, como aporte de nutrientes, modulação do ciclo celular e apoptose.

## 1.12 Transdução de Sinal em células de mamíferos – $Ca^{2+}$ e $IP_3$

A sinalização por cálcio é crítica para todas as células. Como um íon livre, o  $Ca^{2+}$  integra muitos estímulos fisiológicos aos seus efetores intracelulares, ao interagir com proteínas de ligação cuja consolidação determina os efeitos celulares da estimulação (Friel, 2008).

O cálcio é um segundo mensageiro ubiquitário que regula várias atividades em diferentes tipos de célula. Por exemplo, o  $Ca^{2+}$  em hepatócitos regula processos variados como transporte ácido da bile, a secreção da mesma,

exocitose, permeabilidade celular, metabolismo da glicose, o estado redox mitocondrial, transcrição gênica, crescimento celular e apoptose (Gomes , *et al.*, 2006).

As células eucarióticas possuem um sistema de transporte de cálcio na membrana plasmática, no retículo endoplasmático e na mitocôndria, a primeira possuindo uma  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase específica (PMCA) que exporta cálcio intracelular ativamente para o meio extracelular, um canal de cálcio e um trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Pozzan, 1994).

Um dos mecanismos centrais de respostas celulares mediadas por concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  envolve a liberação deste cátion de estoques do retículo endoplasmático para o citoplasma. Em uma variedade de células, esta sinalização por  $\text{Ca}^{2+}$  é mediada pelo canal de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  associado à membrana do retículo endoplasmático, o receptor inositol-1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) (Berridge, *et al.*, 2003). Como um transdutor de sinal entre os dois segundo mensageiros ubiquitários D-mio-inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e  $\text{Ca}^{2+}$ , o  $\text{IP}_3\text{R}$  desempenha um papel crucial no controle de processos celulares e fisiológicos tão diversos quanto à divisão celular, proliferação celular, apoptose, fertilização, desenvolvimento, comportamento, memória, e aprendizado (Furuichi e Mikoshiba, 1995).

Os receptores de  $\text{IP}_3$  são altamente ubiquitários, e têm sido encontrados em diversos organismos, desde humanos até *C. elegans*. OS  $\text{IP}_3\text{R}$  de mamíferos possuem três isoformas distintas, com arquitetura molecular idêntica, formando canais funcionais homo ou heterotetraméricos (Taylor, *et al.*, 1999). O receptor de  $\text{IP}_3$  do tipo 1 de camundongo é um polipeptídio de 2749 aminoácidos com 5 regiões funcionalmente distintas: as regiões  $\text{IP}_3$  supressora e ligante de  $\text{IP}_3$ , N-terminais, a região moduladora central, e as regiões C-terminais de canal e acopladora. Uma construção central da região de ligação (resíduos 224-579) demonstrou possuir alta afinidade pelo  $\text{IP}_3$  (Yoshikawa, *et al.*, 1996). Esta alta afinidade é atenuada a uma afinidade fisiológica, na presença do domínio supressor N-terminal ( $\text{IP}_3\text{R}_{\text{sup}}$ ) (Yoshikawa, *et al.*, 1999b). A proteína RACK1

interage com o receptor de IP<sub>3</sub> em dois segmentos. Um deles (resíduos 580-600) reside dentro da região supressora de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>Rsup) (Patterson, *et al.*, 2004).

### 1.13 Compostos fotossensíveis

Um composto *caged* é uma molécula biologicamente relevante, que é inativada através da ligação de um agrupamento químico, através de uma ponte fotolábil. A molécula em sua forma ativa é liberada quando a ligação com a gaiola inativadora é rompida através de um pulso de luz intensa, geralmente na faixa da luz ultravioleta (UV). Uma das vantagens desta técnica é que um determinado sistema celular de interesse pode ser carregado com uma quantidade conhecida da molécula, que pode ser por exemplo um segundo mensageiro, em sua forma inativa, e então ser ativada em um momento preciso. Esta técnica se mostra poderosa ao isolar o efeito da molécula de interesse no sistema estudado.

O desenvolvimento de compostos biologicamente ativos, que podem ser ativados através de um pulso de luz, se iniciou na década de 1970 (Ellis-Davies, 2006). A fotoliberação de compostos *caged* se desenvolveu inicialmente em moléculas normalmente produzidas pelas células e tecidos, como ATP e neurotransmissores. Atualmente, os números de compostos têm aumentado exponencialmente, incluindo toda a gama de neurotransmissores, como serotonina, dopamina, epinefrina, glicina; segundo mensageiros como nucleotídeos cíclicos, ADP-ribose cíclica, ácido araquidônico e moléculas de Ca<sup>2+</sup> (Giovannardi, *et al.*, 1998). Virtualmente qualquer molécula de interesse biológico pode ser transformada em fotolábil no próprio laboratório, através do uso de kits comercialmente disponíveis.

Porém apenas recentemente em 2006 Kantevari e colaboradores conseguiram sintetizar uma molécula de IP<sub>3</sub> que possuísse ao mesmo tempo a gaiola fotossensível, que torna o composto ativo após um pulso de luz UV, e o agrupamento éster, que torna o marcador um sal permeante de membranas celulares. Esta molécula une as vantagens da responsividade dependente de luz,

que pode ser precisamente controlada quanto a sua duração, localização e dosagem, dispensando ao mesmo tempo a necessidade de microinjeção do composto nas células a serem estudadas, prática comum até então. A molécula, denominada (6-ortho-nitroveratril)-IP<sub>3</sub> (6-NV-IP<sub>3</sub>), possui um coeficiente de extinção de 5000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 350 nm, com uma absorbância suficiente para a excitação bifotônica em células vivas (Kantevari, *et al.*, 2006). Estas moléculas vêm sendo extensivamente utilizadas na compreensão de mecanismos de transdução de sinal de células em diversos modelos, como por exemplo na compreensão da regulação do receptor de IP<sub>3</sub> por glicosilação (Rengifo, *et al.*, 2007), a sinalização por Ca<sup>2+</sup> envolvida na regeneração hepática (Nicou, *et al.*, 2007) ou ainda nos mecanismos de transdução de proteínas *heat shock* por IP<sub>3</sub> na planta *Arabidopsis thaliana* (Liu, *et al.*, 2006).

### 1.14 Transdução de Sinal em *Plasmodium*

A pesquisa dos mecanismos de transdução de sinal por Ca<sup>2+</sup> no parasita da malária representa um alvo em potencial, podendo levar ao desenvolvimento de novos quimioterápicos (Passos e Garcia, 1998; Dluzewski e Garcia, *et al.*, 1996; Marchesini, *et al.*, 2000; Varotti, *et al.*, 2003, Gazarini, 2003) Além de estratégias para armazenar Ca<sup>2+</sup>, o parasita se adaptou para utilizar Ca<sup>2+</sup> como um mensageiro sinalizador (Hotta, *et al.*, 2000; Gazarini, *et al.*, 2003). Esta afirmação se encontra em concordância com a presença de pelo menos 30 proteínas contendo motivos EF de ligação de Ca<sup>2+</sup> no genoma do *Plasmodium* (Aravind, *et al.*, 2003).

Apesar do parasita da malária se desenvolver dentro de outra célula, a sinalização por Ca<sup>2+</sup> parece ser um mecanismo importante no desenvolvimento do *Plasmodium* em sua fase intraeritrocítica (Garcia, 1999; Gazarini, *et al.*, 2003; Varotti, *et al.*, 2003). Durante o processo de exflagelação, foi reportada a produção de segundo mensageiros cGMP, DAG, e IP<sub>3</sub>, este último promovendo liberação de

Ca<sup>2+</sup> de organelas intracelulares (Passos e Garcia, 1998; Kawamoto, *et al.*, 1990; Carucci, *et al.*, 2000; Martin, *et al.*, 1994).

Foi reportado pelo nosso laboratório que *Plasmodium* utiliza o hormônio melatonina do hospedeiro para modular seu ciclo de vida (Hotta, *et al.*, 2000). O efeito da melatonina parece depender da produção de AMPc e Ca<sup>2+</sup> (Beraldo, *et al.*, 2005). Também foi recentemente demonstrado por nosso grupo que *Plasmodium* cria um microambiente na célula parasitada (o vacúolo parasitóforo) rico em Ca<sup>2+</sup>, necessário para que a via de sinalização por Ca<sup>2+</sup> seja integralmente explorada (Camacho, 2003; Gazarini, *et al.*, 2003). Estes e outros dados de diferentes laboratórios suportam a noção que o plasmódio, como a maioria das outras células eucarióticas, utiliza a via de sinalização por Ca<sup>2+</sup> para o controle de um número de funções vitais (Passos e Garcia, 1998; Garcia, 1999; Garcia, *et al.*, 1996, 1998; Hotta, *et al.*, 2000; Marchesini, *et al.*, 2000; Alleva e Kirk, 2001; Varotti, *et al.*, 2003).

O ciclo de vida do parasita da malária inclui uma série de eventos complexos porém bem sincronizados. Após a invasão do eritrócito, o parasita pode se propagar ou se diferenciar sexualmente. O papel de sinais intracelulares e eventos moleculares na modulação do ciclo de vida do *Plasmodium* não é bem conhecido. Entretanto, é amplamente aceito que o destino da maior parte das células eucarióticas é controlado por vias de sinalização celular. É, portanto, razoável a idéia que cascatas de sinalização celular sejam importantes para o desenvolvimento do parasita. O seqüenciamento do genoma de *P. falciparum* (Gardner, *et al.*, 2002), assim como estudos anteriores sugerem que várias proteínas homólogas de vias de sinalização celular de eucariotos, como proteínas quinases e fosfatases, estão conservadas em *P. falciparum*.

A investigação de tais eventos se torna, portanto extremamente relevante na compreensão da biologia celular e molecular deste parasita, com o claro objetivo de revelar novos alvos para o desenvolvimento de drogas antimaláricas.

## **5 CONCLUSÕES**

Através do conjunto de experimentos realizados nestes dois estudos paralelos envolvendo as proteínas colina quinase (PfChok) e receptor para quinase C ativada (RACK) do agente etiológico da malária *Plasmodium falciparum* demonstramos que:

- A enzima PfChok foi clonada e expressa de forma bem sucedida em sistema heterólogo bacteriano.
- A enzima assim obtida e posteriormente purificada encontra-se com estrutura tridimensional preservada, pois manteve atividade enzimática.
- A partir de anticorpo policlonal gerado contra a PfChok foi possível observar que esta se encontra expressa nas três fases de desenvolvimento do ciclo intra-eritrocítico de *Plasmodium falciparum*, demonstrando localização citossólica. Somente o parasita *P. falciparum* foi reconhecido por este anticorpo, indicando uma especificidade epitotípica alta da enzima.
- O análogo de colina, o hemicholinium-3, não foi capaz de alterar a distribuição da estrutura secundária da PfChok, mas a presença de ambiente apolar modificou sua estrutura em espectro de triptofano, o que indicaria uma preferência por ambientes lipofílicos, como o encontrado em membranas.
- A síntese e processamento da PfChok parece ser Brefeldina A-independente, já que este composto não alterou a distribuição subcelular da enzima em *P. falciparum*.
- Foi possível realizar através de modelagem comparativa, utilizando dados estruturais da colina quinase de *Plasmodium knowlesi*, um modelo tridimensional da PfChok, que demonstrou possuir sítios de fosforilação para tirosina quinase, proteína quinase C (PKC) e caseína quinase II conservados. Estes referidos sítios poderiam ser utilizados no desenvolvimento de novas classes de inibidores, contornando a patente obtida para desenvolvimento de inibidores derivados de colina.
- A PfRACK transfectada em diversos modelos de células de mamíferos se localiza subcelularmente de maneira distinta da proteína endógena RACK1.



- A proteína PfRACK transfectada em células humanas HEK 293 demonstrou ser capaz de inibir a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  da referida célula, e esta inibição é diretamente dependente da inibição da ligação de  $\text{IP}_3$  nos receptores para este agonista do retículo endoplasmático de células HEK 293.

Esta inibição de sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos por  $\text{IP}_3$  realizado pela proteína PfRACK também demonstra que:

- Ocorreu acoplamento bem sucedido e posterior expressão de um gene do parasita.
- O produto protéico resultante da expressão do gene do parasita, resultante de uma construção 100% sintética e códon otimizada foi capaz de promover uma alteração fenotípica em uma célula humana.

Estes resultados abrem a possibilidade de estudos de genômica funcional da malária utilizando como modelo sistemas de mamíferos melhor caracterizados, com a possibilidade de transpor teoricamente qualquer gene do parasita da malária para estes modelos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

Al-Anouti F, Ananvoranich S. Comparative analysis of antisense RNA, double-stranded RNA, and delta ribozyme-mediated gene regulation in *Toxoplasma gondii*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2002 Aug;12(4):275-81.

Alleva LM, Kirk K. Calcium regulation in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001 Oct;117(2):121-8.

Anamika, Srinivasan N, Krupa A. A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. *Proteins.* 2005 Jan 1;58(1):180-9.

Ancelin ML, Vial HJ. Choline kinase activity in *Plasmodium*-infected erythrocytes: characterization and utilization as a parasite-specific marker in malarial fractionation studies. *Biochim Biophys Acta.* 1986 Jan 3;875(1):52-8.

Aravind L, Iyer LM, Wellems TE, Miller LH. *Plasmodium* biology: genomic gleanings. *Cell.* 2003 Dec 26;115(7):771-85.

Ballou WR, Hoffman SL, Sherwood JA, Hollingdale MR, Neva FA, Hockmeyer WT, et al. Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet.* 1987 Jun 6;1(8545):1277-81.

Battaini F, Pascale A. Protein kinase C signal transduction regulation in physiological and pathological aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1057:177-92.

Beach DH, Sherman IW, Holz GG, Jr. Lipids of *Plasmodium lophurae*, and of erythrocytes and plasma of normal and *P. lophurae*-infected Pekin ducklings. *J Parasitol.* 1977 Feb;63(1):62-75.

Beraldo FH, Almeida FM, da Silva AM, Garcia CR. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol.* 2005 Aug 15;170(4):551-7.

Beraldo FH, Garcia CR. Products of tryptophan catabolism induce Ca<sup>2+</sup> release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Pineal Res.* 2005 Oct;39(3):224-30.

Berridge MJ. Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature.* 1993 Sep 30;365(6445):388-9.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):517-29.

Berry A, Senescau A, Lelievre J, Benoit-Vical F, Fabre R, Marchou B, et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* cytochrome b gene mutations in isolates imported from Africa, and implications for atovaquone resistance. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Oct;100(10):986-8.

Beverley SM. Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nat Rev Genet.* 2003 Jan;4(1):11-9.

Binder EM, Kim K. Location, location, location: trafficking and function of secreted proteases of *Toxoplasma* and *Plasmodium*. *Traffic.* 2004 Dec;5(12):914-24.

Blaustein MP, Hodgkin AL. The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons. *J Physiol.* 1969 Feb;200(2):497-527.

Blisnick T, Vincensini L, Barale JC, Namane A, Braun Breton C. LANCL1, an erythrocyte protein recruited to the Maurer's clefts during *Plasmodium falciparum* development. *Mol Biochem Parasitol.* 2005 May;141(1):39-47.

Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, et al. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 1;31(1):365-70.

Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2003 Dec;5(12):1051-61.

Bonnefoy S, Menard R. Deconstructing export of malaria proteins. *Cell.* 2008 Jul 11;134(1):20-2.

Burack WR, Shaw AS. Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Apr;12(2):211-6.

Camacho P. Malaria parasites solve the problem of a low calcium environment. *J Cell Biol.* 2003 Apr 14;161(1):17-9.

Carucci DJ. Malaria research in the post-genomic era. *Parasitol Today.* 2000 Oct;16(10):434-8.

Carucci DJ, Witney AA, Muhia DK, Warhurst DC, Schaap P, Meima M, et al. Guanylyl cyclase activity associated with putative bifunctional integral membrane proteins in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 2000 Jul 21;275(29):22147-56.

Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C. Gene silencing in worms and fungi. *Nature*. 2000 Mar 16;404(6775):245.

Chen Y, Ji F, Xie H, Liang J, Zhang J. The regulator of G-protein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol*. 2006 Jan;140(1):302-10.

Choubey V, Guha M, Maity P, Kumar S, Raghunandan R, Maulik PR, et al. Molecular characterization and localization of *Plasmodium falciparum* choline kinase. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jul;1760(7):1027-38.

Craig A, Scherf A. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol*. 2001 Jul;115(2):129-43.

Cuadrado A, Carnero A, Dolfi F, Jimenez B, Lacal JC. Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. *Oncogene*. 1993 Nov;8(11):2959-68.

DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SM, Donelson JE. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Feb;133(2):175-86.

Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Sep;279(3):L429-38.

Dessens JT, Mendoza J, Claudianos C, Vinetz JM, Khater E, Hassard S, et al. Knockout of the rodent malaria parasite chitinase pbCHT1 reduces infectivity to mosquitoes. *Infect Immun*. 2001 Jun;69(6):4041-7.

Deutsch CA, Tewksbury JJ, Huey RB, Sheldon KS, Ghalambor CK, Haak DC, et al. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 6;105(18):6668-72.

Dluzewski AR, Garcia CR. Inhibition of invasion and intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum* by kinase inhibitors. *Experientia*. 1996 Jun 15;52(6):621-3.

Doerig C, Billker O, Pratt D, Endicott J. Protein kinases as targets for antimalarial intervention: Kinomics, structure-based design, transmission-blockade, and targeting host cell enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Dec 30;1754(1-2):132-50.

Donaldson JG, Finazzi D, Klausner RD. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*. 1992 Nov 26;360(6402):350-2.

Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol*. 2003 May;5(5):440-6.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24;411(6836):494-8.

Ellis-Davies GC, Barsotti RJ. Tuning caged calcium: photolabile analogues of EGTA with improved optical and chelation properties. *Cell Calcium*. 2006 Jan;39(1):75-83.

Exton JH. Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J Biol Chem*. 1990 Jan 5;265(1):1-4.

Exton JH. Messenger molecules derived from membrane lipids. *Curr Opin Cell Biol*. 1994 Apr;6(2):226-9.

Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Jun;3(6):509-20.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.

Friel DD, Chiel HJ. Calcium dynamics: analyzing the Ca<sup>2+</sup> regulatory network in intact cells. *Trends Neurosci*. 2008 Jan;31(1):8-19.

Furet P, Caravatti G, Denholm AA, Faessler A, Fretz H, Garcia-Echeverria C, et al. Structure-based design and synthesis of phosphinate isosteres of phosphotyrosine for incorporation in Grb2-SH2 domain inhibitors. Part 1. *Bioorg Med Chem Lett*. 2000 Oct 16;10(20):2337-41.

Furuichi T, Mikoshiba K. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in the brain. *J Neurochem*. 1995 Mar;64(3):953-60.

Furutama D, Shimoda K, Yoshikawa S, Miyawaki A, Furuichi T, Mikoshiba K. Functional expression of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor promoter-lacZ fusion genes in transgenic mice. *J Neurochem*. 1996 May;66(5):1793-801.

Garcia CR. Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. *Parasitol Today*. 1999 Dec;15(12):488-91.

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.

Garcia CR, Dluzewski AR, Catalani LH, Burtling R, Hoyland J, Mason WT. Calcium homeostasis in intraerythrocytic malaria parasites. *Eur J Cell Biol*. 1996 Dec;71(4):409-13.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002;419(6906):498 - 511.

Gazarini ML, Garcia CR. Interruption of the blood-stage cycle of the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi*, by protein tyrosine kinase inhibitors. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Nov;36(11):1465-9.

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 Apr 14;161(1):103-10.

Giovannardi S, Lando L, Peres A. Flash Photolysis of Caged Compounds: Casting Light on Physiological Processes. *News Physiol Sci*. 1998 Oct;13:251-5.

Gomes DA, Leite MF, Bennett AM, Nathanson MH. Calcium signaling in the nucleus. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006 Mar-Apr;84(3-4):325-32.

Hajduk PJ, Boyd S, Nettesheim D, Nienaber V, Severin J, Smith R, et al. Identification of novel inhibitors of urokinase via NMR-based screening. *J Med Chem*. 2000 Oct 19;43(21):3862-6.

Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*. 2001 Feb;2(2):110-9.

Hartl DL. The origin of malaria: mixed messages from genetic diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Jan;2(1):15-22.

Henry M, Briolant S, Fontaine A, Mosnier J, Baret E, Amalvict R, et al. In vitro activity of ferroquine is independent of polymorphisms in transport protein genes implicated in quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Aug;52(8):2755-9.

Heussler V, Sturm A, Langsley G. Regulation of host cell survival by intracellular

- Plasmodium and Theileria parasites. Parasitology. 2006;132 Suppl:S49-60.
- Hoffman SL, Subramanian GM, Collins FH, Venter JC. Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria. Nature. 2002 Feb 7;415(6872):702-9.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, et al. The genome sequence of the malaria mosquito Anopheles gambiae. Science. 2002 Oct 4;298(5591):129-49.
- Honma T, Hayashi K, Aoyama T, Hashimoto N, Machida T, Fukasawa K, et al. Structure-based generation of a new class of potent Cdk4 inhibitors: new de novo design strategy and library design. J Med Chem. 2001 Dec 20;44(26):4615-27.
- Horrocks P, Bowman S, Kyes S, Waters AP, Craig A. Entering the post-genomic era of malaria research. Bull World Health Organ. 2000;78(12):1424-37.
- Hosaka K, Tanaka S, Nikawa J, Yamashita S. Cloning of a human choline kinase cDNA by complementation of the yeast cki mutation. FEBS Lett. 1992 Jun 15;304(2-3):229-32.
- Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, Varotti FP, Lopes C, Markus RP, et al. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. Nat Cell Biol. 2000 Jul;2(7):466-8.
- Jackowski S. Coordination of membrane phospholipid synthesis with the cell cycle. J Biol Chem. 1994 Feb 4;269(5):3858-67.
- Jakoby WB, Ziegler DM. The enzymes of detoxication. J Biol Chem. 1990 Dec 5;265(34):20715-8.
- Janardhan S, Srivani P, Sastry GN. Choline kinase: an important target for cancer. Curr Med Chem. 2006;13(10):1169-86.
- Jenkins GM, Frohman MA. Phospholipase D: a lipid centric review. Cell Mol Life Sci. 2005 Oct;62(19-20):2305-16.
- Kantevari S, Hoang CJ, Ogrodnik J, Egger M, Niggli E, Ellis-Davies GC. Synthesis and two-photon photolysis of 6-(ortho-nitroveratryl)-caged IP3 in living cells. ChemBiochemistry. 2006 Jan;7(1):174-80.
- Kappes B, Doerig CD, Graeser R. An overview of Plasmodium protein kinases. Parasitol Today. 1999 Nov;15(11):449-54.
- Kariu T, Yuda M, Yano K, Chinzei Y. MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. J Exp Med. 2002 May 20;195(10):1317-23.

Kawamoto F, Alejo-Blanco R, Fleck SL, Kawamoto Y, Sinden RE. Possible roles of Ca<sup>2+</sup> and cGMP as mediators of the exflagellation of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1990 Aug;42(1):101-8.

Kawamoto T, Shimizu M. Changes in the mode of calcium and phosphate transport during rat incisal enamel formation. *Calcif Tissue Int*. 1990 Jun;46(6):406-14.

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2001 Oct 15;15(20):2654-9.

Kirchhausen T. Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Dec;1(3):187-98.

Kirk K. Channels and transporters as drug targets in the *Plasmodium*-infected erythrocyte. *Acta Trop*. 2004 Feb;89(3):285-98.

Kirk K, Saliba KJ. Targeting nutrient uptake mechanisms in *Plasmodium*. *Curr Drug Targets*. 2007 Jan;8(1):75-88.

Klemba M, Goldberg DE. Characterization of plasmepsin V, a membrane-bound aspartic protease homolog in the endoplasmic reticulum of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 Oct;143(2):183-91.

Knebel A, Morrice N, Cohen P. A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38 delta. *EMBO J*. 2001 Aug 15;20(16):4360-9.

Kocken CH, Withers-Martinez C, Dubbeld MA, van der Wel A, Hackett F, Valderrama A, et al. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect Immun*. 2002 Aug;70(8):4471-6.

Kun JF, Hibbs AR, Saul A, McColl DJ, Coppel RL, Anders RF. A putative *Plasmodium falciparum* exported serine/threonine protein kinase. *Mol Biochem Parasitol*. 1997 Mar;85(1):41-51.

Lacal JC. Choline kinase: a novel target for antitumor drugs. *IDrugs*. 2001 Apr;4(4):419-26.

Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979 Jun;65(3):418-20.



Langsley G, van Noort V, Carret C, Meissner M, de Villiers EP, Bishop R, et al. Comparative genomics of the Rab protein family in Apicomplexan parasites. *Microbes Infect.* 2008 Apr;10(5):462-70.

Lanzer M, Wickert H, Krohne G, Vincensini L, Braun Breton C. Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Int J Parasitol.* 2006 Jan;36(1):23-36.

Leite MF, Thrower EC, Echevarria W, Koulen P, Hirata K, Bennett AM, et al. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 4;100(5):2975-80.

Lin X, Varnai P, Csordas G, Balla A, Nagai T, Miyawaki A, et al. Control of calcium signal propagation to the mitochondria by inositol 1,4,5-trisphosphate-binding proteins. *J Biol Chem.* 2005 Apr 1;280(13):12820-32.

Liu HT, Gao F, Cui SJ, Han JL, Sun DY, Zhou RG. Primary evidence for involvement of IP3 in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell Res.* 2006 Apr;16(4):394-400.

Liu J, Gluzman IY, Drew ME, Goldberg DE. The role of *Plasmodium falciparum* food vacuole plasmepsins. *J Biol Chem.* 2005 Jan 14;280(2):1432-7.

Liu J, Istvan ES, Gluzman IY, Gross J, Goldberg DE. *Plasmodium falciparum* ensures its amino acid supply with multiple acquisition pathways and redundant proteolytic enzyme systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 6;103(23):8840-5.

Ludwig AA, Romeis T, Jones JD. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J Exp Bot.* 2004 Jan;55(395):181-8.

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 Jul 11;306(4):995-1001.

Maeda S. [Angiotensin II decreases atrial natriuretic peptide-induced cyclic GMP accumulation in rat glomerular mesangial cells]. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 1990 Feb;32(2):183-90.

Maier AG, Rug M, O'Neill MT, Brown M, Chakravorty S, Szeszak T, et al. Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Cell.* 2008 Jul 11;134(1):48-61.

Malhotra P, Dasaradhi PV, Kumar A, Mohammed A, Agrawal N, Bhatnagar RK, et al. Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-

1 and -2) of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2002 Sep;45(5):1245-54.

Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*. 2002 Jul;10(1):151-62.

Marchesini N, Luo S, Rodrigues CO, Moreno SN, Docampo R. Acidocalcisomes and a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in malaria parasites. *Biochem J*. 2000 Apr 1;347 Pt 1:243-53.

Martin SK, Jett M, Schneider I. Correlation of phosphoinositide hydrolysis with exflagellation in the malaria microgametocyte. *J Parasitol*. 1994 Jun;80(3):371-8.

Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta*. 1986 Jun 13;858(1):161-8.

McRobert L, McConkey GA. RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002 Feb;119(2):273-8.

Medica DL, Sinnis P. Quantitative dynamics of *Plasmodium yoelii* sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infect Immun*. 2005 Jul;73(7):4363-9.

Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*. 1998 Jun 1;332 ( Pt 2):281-92.

Menard R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes Infect*. 2000 May;2(6):633-42.

Mikoshiba K, Furuichi T, Miyawaki A. Structure and function of IP3 receptors. *Semin Cell Biol*. 1994 Aug;5(4):273-81.

Min-Oo G, Fortin A, Tam MF, Nantel A, Stevenson MM, Gros P. Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nat Genet*. 2003 Dec;35(4):357-62.

Mohammed A, Dasaradhi PV, Bhatnagar RK, Chauhan VS, Malhotra P. In vivo gene silencing in *Plasmodium berghei*--a mouse malaria model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Sep 26;309(3):506-11.

Monkawa T, Miyawaki A, Sugiyama T, Yoneshima H, Yamamoto-Hino M, Furuichi T, et al. Heterotetrameric complex formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunits. *J Biol Chem*. 1995 Jun 16;270(24):14700-4.

Mota MM, Rodriguez A. Migration through host cells by apicomplexan parasites.

Microbes Infect. 2001 Nov;3(13):1123-8.

Mulenga M, Malunga P, Bennett S, Thuma PE, Shulman C, Fielding K, et al. Factors associated with severe anaemia in Zambian children admitted with *Plasmodium falciparum* malarial anaemia. *Ann Trop Paediatr*. 2005 Jun;25(2):87-90.

Nebenfuhr A, Ritzenthaler C, Robinson DG, Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol*. 2002 Nov;130(3):1102-8.

Newton KJ, Winberg B, Yamato K, Lupold S, Stern DB. Evidence for a novel mitochondrial promoter preceding the *cox2* gene of perennial teosintes. *EMBO J*. 1995 Feb 1;14(3):585-93.

Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14687-92.

Nicou A, Serriere V, Hilly M, Prigent S, Combettes L, Guillon G, et al. Remodelling of calcium signalling during liver regeneration in the rat. *J Hepatol*. 2007 Feb;46(2):247-56.

Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*. 1988 Aug 25;334(6184):661-5.

Nishizuka Y. Membrane phospholipid degradation and protein kinase C for cell signalling. *Neurosci Res*. 1992 Oct;15(1-2):3-5.

Omara-Opyene AL, Moura PA, Sulsona CR, Bonilla JA, Yowell CA, Fujioka H, et al. Genetic disruption of the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole plasmepsins demonstrates their functional redundancy. *J Biol Chem*. 2004 Dec 24;279(52):54088-96.

Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*. 2000 Mar 16;404(6775):307-10.

Pandey KC, Sijwali PS, Singh A, Na BK, Rosenthal PJ. Independent intramolecular mediators of folding, activity, and inhibition for the *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2. *J Biol Chem*. 2004 Jan 30;279(5):3484-91.

Parker JC. Effects of drugs on calcium-related phenomena in red blood cells. *Fed Proc*. 1981 Dec;40(14):2872-6.

Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci*. 2004 Jan 15;117(Pt 2):131-

2.

Passos AP, Garcia CR. Inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca<sup>2+</sup> release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite *P. chabaudi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Apr 7;245(1):155-60.

Patterson RL, van Rossum DB, Barrow RK, Snyder SH. RACK1 binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and mediates Ca<sup>2+</sup> release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 24;101(8):2328-32.

Patz JA, Campbell-Lendrum D, Holloway T, Foley JA. Impact of regional climate change on human health. *Nature*. 2005 Nov 17;438(7066):310-7.

Peisach D, Gee P, Kent C, Xu Z. The crystal structure of choline kinase reveals a eukaryotic protein kinase fold. *Structure*. 2003 Jun;11(6):703-13.

Pierce DW, Boxer SG. Stark effect spectroscopy of tryptophan. *Biophys J*. 1995 Apr;68(4):1583-91.

Plowe CV. Antimalarial drug resistance in Africa: strategies for monitoring and deterrence. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;295:55-79.

Porter TJ, Kent C. Purification and characterization of choline/ethanolamine kinase from rat liver. *J Biol Chem*. 1990 Jan 5;265(1):414-22.

Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev*. 1994 Jul;74(3):595-636.

Rengifo J, Gibson CJ, Winkler E, Collin T, Ehrlich BE. Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type I by O-GlcNAc glycosylation. *J Neurosci*. 2007 Dec 12;27(50):13813-21.

Reuter H, Seitz N. The ionic dependence of calcium efflux from guinea pig auricles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*. 1968;259(2):190.

Rodriguez MM, Ron D, Touhara K, Chen CH, Mochly-Rosen D. RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro. *Biochemistry*. 1999 Oct 19;38(42):13787-94.

Rodriguez-Gonzalez A, Ramirez de Molina A, Fernandez F, Ramos MA, del Carmen Nunez M, Campos J, et al. Inhibition of choline kinase as a specific cytotoxic strategy in oncogene-transformed cells. *Oncogene*. 2003 Dec 4;22(55):8803-12.

Roiz D, Eritja R, Molina R, Melero-Alcibar R, Lucientes J. Initial distribution assessment of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the Barcelona, Spain, area. *J Med Entomol.* 2008 May;45(3):347-52.

Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 1;91(3):839-43.

Saul A, Battistutta D. Codon usage in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1988 Jan 1;27(1):35-42.

Scarpa J, Gatlin DM, 3rd. Responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) swim-up fry to dietary calcium in soft and hard water. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 1993 Dec;106(4):803-8.

Schechtman D, Mochly-Rosen D. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene.* 2001 Oct 1;20(44):6339-47.

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science.* 2000 Sep 15;289(5486):1938-42.

Sherman IW, Eda S, Winograd E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes Infect.* 2003 Aug;5(10):897-909.

Sherman IW, Jones LA. *Plasmodium lophurae*: membrane proteins of erythrocyte-free plasmodia and malaria-infected red cells. *J Protozool.* 1979 Aug;26(3):489-501.

Singer SJ. Some early history of membrane molecular biology. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:1-27.

Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2005;434(7030):214 - 7.

Snow RW, Korenromp EL, Gouws E. Pediatric mortality in Africa: *plasmodium falciparum* malaria as a cause or risk? *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Aug;71(2 Suppl):16-24.

Souroujon MC, Mochly-Rosen D. Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling. *Nat Biotechnol.* 1998 Oct;16(10):919-24.

Stoute JA, Gombe J, Withers MR, Siangla J, McKinney D, Onyango M, et al. Phase 1 randomized double-blind safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* malaria merozoite surface protein FMP1 vaccine, adjuvanted with AS02A, in adults in western Kenya. *Vaccine*. 2007 Jan 2;25(1):176-84.

Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, Momin P, Kester KE, Desmons P, et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N Engl J Med*. 1997 Jan 9;336(2):86-91.

Sultan AA, Thathy V, Frevert U, Robson KJ, Crisanti A, Nussenzweig V, et al. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell*. 1997 Aug 8;90(3):511-22.

Taylor CW, Genazzani AA, Morris SA. Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium*. 1999 Dec;26(6):237-51.

Taylor SC, Peers C. Store-operated  $Ca^{2+}$  influx and voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels coupled to exocytosis in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Neurochem*. 1999 Aug;73(2):874-80.

Tonhosolo R, D'Alexandri FL, Genta FA, Wunderlich G, Gozzo FC, Eberlin MN, et al. Identification, molecular cloning and functional characterization of an octaprenyl pyrophosphate synthase in intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2005 Nov 15;392(Pt 1):117-26.

Tonkin CJ, Pearce JA, McFadden GI, Cowman AF. Protein targeting to destinations of the secretory pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Aug;9(4):381-7.

Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976 Aug 20;193(4254):673-5.

Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*. 1999 Dec 15;13(24):3191-7.

Ueda N, Shah SV. Apoptosis. *J Lab Clin Med*. 1994 Aug;124(2):169-77.

Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol*. 2004 Jun;6(6):509-19.

Varnai P, Lin X, Lee SB, Tuymetova G, Bondeva T, Spat A, et al. Inositol lipid binding and membrane localization of isolated pleckstrin homology (PH) domains. Studies on the PH domains of phospholipase C delta 1 and p130. *J Biol Chem*.

2002 Jul 26;277(30):27412-22.

Varotti FP, Beraldo FH, Gazarini ML, Garcia CR. Plasmodium falciparum malaria parasites display a THG-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool. Cell Calcium. 2003 Feb;33(2):137-44.

Vial HJ, Thuet MJ, Philippot JR. Phospholipid biosynthesis in synchronous Plasmodium falciparum cultures. J Protozool. 1982 May;29(2):258-63.

Vivian JT, Callis PR. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. Biophys J. 2001 May;80(5):2093-109.

Wanderley JL, Benjamin A, Real F, Bonomo A, Moreira ME, Barcinski MA. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/Leishmania interplay. Braz J Med Biol Res. 2005 Jun;38(6):807-12.

Wang H, Friedman E. Increased association of brain protein kinase C with the receptor for activated C kinase-1 (RACK1) in bipolar affective disorder. Biol Psychiatry. 2001 Sep 1;50(5):364-70.

Ward P, Equinet L, Packer J, Doerig C. Protein kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum: the kinome of a divergent eukaryote. BMC Genomics. 2004 Oct 12;5(1):79.

Waterkeyn JG, Wickham ME, Davern KM, Cooke BM, Coppel RL, Reeder JC, et al. Targeted mutagenesis of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. EMBO J. 2000 Jun 15;19(12):2813-23.

Welburn SC, Murphy NB. Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms. Cell Death Differ. 1998 Jul;5(7):615-22.

Wengelnik K, Vidal V, Ancelin ML, Cathiard AM, Morgat JL, Kocken CH, et al. A class of potent antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes. Science. 2002 Feb 15;295(5558):1311-4.

Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. J Cell Sci. 2005 Mar 1;118(Pt 5):843-6.

Westbrook J, Feng Z, Chen L, Yang H, Berman HM. The Protein Data Bank and structural genomics. Nucleic Acids Res. 2003 Jan 1;31(1):489-91.

Wojcik C, Fabunmi R, DeMartino GN. Modulation of gene expression by RNAi. Methods Mol Med. 2005;108:381-93.

Yoshikawa F, Iwasaki H, Michikawa T, Furuichi T, Mikoshiba K. Trypsinized cerebellar inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Structural and functional coupling of cleaved ligand binding and channel domains. *J Biol Chem.* 1999 Jan 1;274(1):316-27.

Yoshikawa F, Iwasaki H, Michikawa T, Furuichi T, Mikoshiba K. Cooperative formation of the ligand-binding site of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor by two separable domains. *J Biol Chem.* 1999 Jan 1;274(1):328-34.

Yoshikawa F, Morita M, Monkawa T, Michikawa T, Furuichi T, Mikoshiba K. Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* 1996 Jul 26;271(30):18277-84.

Zhang WW, Matlashewski G. Analysis of antisense and double stranded RNA downregulation of A2 protein expression in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Apr 15;107(2):315-9.

Zhu X, Kim JL, Newcomb JR, Rose PE, Stover DR, Toledo LM, et al. Structural analysis of the lymphocyte-specific kinase Lck in complex with non-selective and Src family selective kinase inhibitors. *Structure.* 1999 Jun 15;7(6):651-61.