

UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS BIOQUÍMICAS EN COMBINACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A CALCIO EN *PLASMODIUM FALCIPARUM*

por

Rodrigo Cabrera¹ & Moisés Wasserman²

Resumen

Cabrera R. & Wasserman M.: Utilización de técnicas bioquímicas en combinación para la detección de proteínas de unión a calcio en *plasmodium falciparum*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 27(102): 125-131. 2003. ISSN 0370-3908.

El calcio juega un papel fundamental durante el desarrollo del parásito intracelular *Plasmodium falciparum*, agente causante de la malaria. Con el objeto de entender mejor el mecanismo como actúa el calcio en este parásito, se detectaron proteínas de unión a calcio en este organismo. El uso combinando del colorante metacromático «Stains-all» y la técnica de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ overlay permitió detectar 9 proteínas de unión a calcio, 6 de las cuales no parecen corresponder a proteínas previamente identificadas, en parásitos maduros. Adicionalmente se determinó que el uso de estas técnicas es un ensayo que puede ser usado durante la detección y purificación de proteínas de unión a calcio.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, Proteínas de unión a calcio, «Stains-all», ^{45}Ca Overlay, PfERC, PfSub-1, Calmodulina, Calcio.

Abstract

Calcium plays a fundamental role in the development of *Plasmodium falciparum*, the intracellular parasite that causes malaria. With the purpose of understanding the mechanism by which calcium acts in this parasite, Calcium-binding proteins were detected in this organism. The combined use of

1. Universidad de los Andes. Correo electrónico: rodrigocabrera_@hotmail.com

2. Laboratorio de Bioquímica. Instituto Nacional de Salud y Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica LIBBIQ. Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Correo electrónico: mwasser@ciencias.unal.edu.co

the metachromatic dye "Stains-all" and the ^{45}Ca Overlay assay allowed the identification, in mature parasites, of 9 calcium-binding proteins, 6 of which seem to be different from any reported calcium-binding protein. Additionally, it was determined that the combined use of these techniques can be useful for the detection and purification of calcium-binding proteins.

Key words: *Plasmodium falciparum*, Calcium-binding proteins, "Stains-all", ^{45}Ca Overlay, PfERC, PfSub-1, Calmodulin, Calcium.

Introducción

El ión calcio (Ca^{2+}) es un importante mensajero intracelular en organismos eucariotas. La concentración citoplasmática de este ión es alterada súbitamente por diferentes estímulos, y, al hacerlo, genera una variedad de respuestas. Entre los múltiples eventos mediados por Ca^{2+} algunos ejemplos son la conducción de estímulos nerviosos, la división celular y la coagulación de la sangre, todos eventos repentinos inducidos por diferentes señales. Los eventos celulares mediados por Ca^{2+} son modulados por proteínas con diversas estructuras y funciones que son capaces de unirse físicamente al ión, y al hacerlo, generar una respuesta (Berridge MJ et al. 2000). Aunque el principal receptor de calcio en las células es la calmodulina, existe un gran número de proteínas que unen calcio.

El papel del calcio en el desarrollo de *Plasmodium falciparum*, el parásito causante de la forma más severa y ampliamente distribuida de malaria, ha sido estudiado con bastante intensidad en los últimos veinte años, y se ha concluido que tiene un rol fundamental en su desarrollo (Krungkrai, J et al. 1982; Tanabe, K et al. 1982; Tanabe, K et al. 1988). Se ha demostrado que en el ciclo asexual del parásito existen eventos de señalización mediados por Ca^{2+} que son indispensables para su desarrollo. Específicamente, se ha visto que la ausencia de Ca^{2+} impide la invasión de eritrocitos por parte del parásito, e interrumpe su desarrollo 16 a 20 horas después de la invasión (Wasserman, M et al. 1982). La naturaleza de estos eventos no se conoce, pero, como son procesos indispensables para la multiplicación del parásito, su inhibición es un enfoque potencial en el tratamiento de la enfermedad.

Se han realizado numerosos estudios sobre el papel que puede jugar la calmodulina en el desarrollo del parásito y la posibilidad de diseñar medicamentos que interfieran con su acción (Robson KJ et al. 1991; Robson KJ 1993; Scheibel LW et al. 1987). Sin embargo, más recientemente la investigación sobre el papel del calcio en el desarrollo de este parásito se ha volcado sobre otras proteínas de unión a calcio. Enfoques moleculares han permitido identificar por lo menos 5 proteínas de unión a calcio que se expresan en el ciclo asexual del parásito

(Blackman MJ et al. 1998; Bhisutthibhan J et al. 1999; La Greca N et al. 1997; Mohrle JJ 1997; Zhao Y et al. 1992; Zhao Y et al. 1993). Sin embargo, estos estudios sólo logran encontrar proteínas de unión a calcio que presenten dominios de unión a calcio homólogos a los registrados en la literatura.

Con el objeto de iniciar un estudio sobre las proteínas de unión a Ca^{2+} que pueden jugar un papel en la señalización mediada por Ca^{2+} en el desarrollo del parásito, se realizó una búsqueda de proteínas capaces de unir Ca^{2+} en *Plasmodium falciparum*. A diferencia de estudios anteriores, en el presente estudio se utilizó un enfoque bioquímico para la búsqueda de estas proteínas, similar al que ha sido utilizado para encontrar proteínas de unión a calcio en otros organismos (Haghighat NG et al. 1992). El uso de técnicas novedosas de coloración y marcación específica permitió detectar nueve proteínas de unión a Ca^{2+} en extractos proteicos de parásitos maduros. Tres de éstas presentan pesos moleculares que corresponden a proteínas de unión a Ca^{2+} reportadas en la literatura, pero las seis restantes parecen ser proteínas novedosas. El estudio de estas proteínas novedosas puede ayudar a entender mejor los procesos de señalización en este parásito y eventualmente servir de fundamento para el desarrollo de nuevos tratamientos para combatir la enfermedad.

Materiales y métodos

Cultivo de parásitos y extracción de proteínas

Se realizó un cultivo de las formas asexuales de *P. falciparum* en eritrocitos humanos según Trager y Jensen (Trager W et al. 1976). Se recogieron parásitos maduros (36 h) a una parasitemia del 5% y se trataron con 0.15% saponina por 10 min. para lisar los eritrocitos. Se centrifugó a 27,000 g por 1 h. y se removieron manualmente los restos de membrana de eritrocito. Se resuspendió el pellet en buffer de extracción (20 mM Hepes/KOH pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF e inhibidores de proteasas: Pepstatina A 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinina 17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fenantrolina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Benzamida hidrocloreuro 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se trató con ultrasonido por 2 min y se centrifugó a 27,000

g por 15 min. Se clarificó el sobrenadante por medio de centrifugación a 100,000 g por 1 h. Como control, se tomaron cantidades similares de eritrocitos no-infectados y se les sometió al mismo procedimiento.

SDS-PAGE y transferencia a membranas

Se trataron los extractos de proteína con buffer muestra de Laemmli por 5 min a 90 °C y se analizaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) usando un sistema discontinuo (Laemmli UK et al. 1973) con un gel concentrador de 4.4% acrilamida total/2.3% bisacrilamida en 0.250 M Tris-PO₄, pH 6.8 y gel separador de 7% acrilamida total/3% bisacrilamida en 0.750 M Tris-Cl, pH 8.8 para separar proteínas de alto peso molecular o gel separador de 12% acrilamida total/4% bisacrilamida en 0.750 M Tris-Cl, pH 8.8 para separar proteínas de bajo peso molecular. En algunos casos se transfirieron los contenidos de estos geles a membranas de PVDF en cámaras Hoeffer por 20 h. a 20V. En todos los casos se corrió un carril con marcadores de peso molecular preteñidos (BRL).

Detección de proteínas de unión a calcio por medio de tinción con el colorante metacromático "Stains-all"

Se ha señalado que el colorante metacromático "Stains-all" es capaz de generar una coloración diferencial para proteínas de unión a calcio. En el presente estudio se utilizó el método de Campbell (Campbell KP et al. 1983) modificado según Maruyama y Nomomura (Maruyama K et al. 1984). Brevemente, después de la electroforesis, se fijaron los geles con 50% metanol/10% ácido acético por 1 h. Se realizaron 3 lavados de 20 min. con 25% metanol para remover el SDS. Se tiñeron los geles en una solución de 0.0025% "Stains-all", 25% metanol, 7.5% formamida, 0.5 mM EGTA y 30 mM Tris/HCl pH 8.8 por 4 horas protegidos de la luz.

Detección de proteínas de unión a calcio por medio de la técnica de ⁴⁵Ca²⁺ Overlay

La técnica de "⁴⁵Ca²⁺ Overlay" reportada por Maruyama (Maruyama K et al. 1984) es un método común de detectar proteínas de unión a calcio. Después de la electroforesis y transferencia a PVDF, se introdujeron las membranas en una solución de 60 mM KCl, 5 mM MgSO₄ y 10 mM imidazol-HCl pH 6.8, haciendo 3 cambios para lavar el buffer del electrodo. Se incubaron las membranas por 10 min. en una solución de 60 mM KCl, 5 mM MgSO₄ 10 mM imidazol-HCl pH 6.8 y 1 mCi/1 ⁴⁵CaCl₂. Se lavaron las membranas con etanol 50% por 5 min. y se secaron. Se expusieron las membranas a una placa de rayos-X por 10 días.

Migración anómala de proteínas de unión a calcio en geles de poliacrilamida con CaCl₂ y EGTA

Se ha reportado que algunas proteínas de unión a calcio presentan migraciones diferentes en SDS-PAGE cuando la electroforesis se lleva a cabo en presencia y ausencia de calcio. Para confirmar la presencia de proteínas de unión a calcio en extractos de *P. falciparum*, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida preparados con 1 mM de CaCl₂ y en geles preparados con 0.1 mM de EGTA. Como control se corrió un carril con 2 mg de calmodulina de testículo bovino (Sigma).

Resultados

Las figuras 1 y 2 muestran las proteínas de unión a calcio presentes en los extractos de *Plasmodium falciparum* detectadas usando la técnica de "⁴⁵Ca²⁺ Overlay". Los carriles 1 corresponden a las autorradiografías que se obtuvieron a partir de las membranas incubadas con ⁴⁵Ca, y las bandas que se observan allí corresponden a proteínas que fueron capaces de unir este calcio. Los carriles 2 muestran el extracto de *Plasmodium falciparum* separado por SDS-PAGE y teñido con "Stains-all" donde se observan algunas bandas que pueden corresponder a proteínas de unión a calcio. En el extracto de proteínas de *Plasmodium falciparum* se pudieron observar 9 proteínas de unión a calcio, con pesos moleculares aproximados de 398, 212, 109, 81, 43, 40, 36, 35 y 17 kDa. Estas proteínas se muestran como bandas azules en los extractos teñidos con "Stains-all" con excepción de la banda número 2 con peso molecular de aproximadamente 212 kDa. En el extracto de eritrocitos no infectados que se usó como control se observaron 9 proteínas de unión a calcio (resultados no mostrados). Sin embargo, el patrón de bandas que se obtuvo fue notablemente diferente en ambos extractos, lo que sugiere que no hay una contaminación significativa de proteínas de eritrocitos no infectados en los extractos de parásito.

Para obtener evidencia experimental adicional de su capacidad de unir calcio, se observó la migración diferencial de las proteínas de unión a calcio en presencia y ausencia de calcio. Las figuras 3 y 4 muestran la migración diferencial de las proteínas de unión a calcio del parásito en electroforesis realizadas en presencia y ausencia de calcio. La figura 3 muestra las proteínas de unión a calcio de alto peso molecular que presentan un cambio en su migración en presencia de calcio. Igualmente, la figura 4 muestra las proteínas de unión a calcio de bajo peso molecular que presentan un cambio en su migración. Se observó que las proteínas correspondientes a las bandas 1, 2, 3, 5 y 6 migran a posiciones marcadamente diferen-

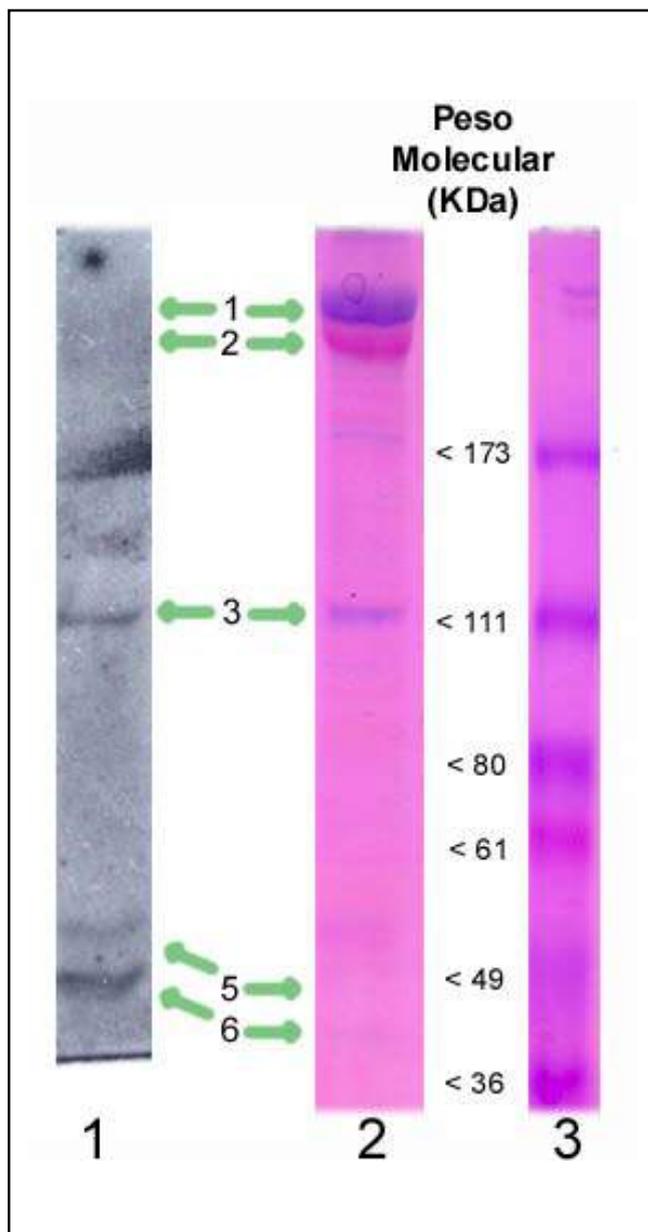


Figura 1. Detección de proteínas de unión a Ca^{2+} de alto peso molecular en *Plasmodium falciparum*.

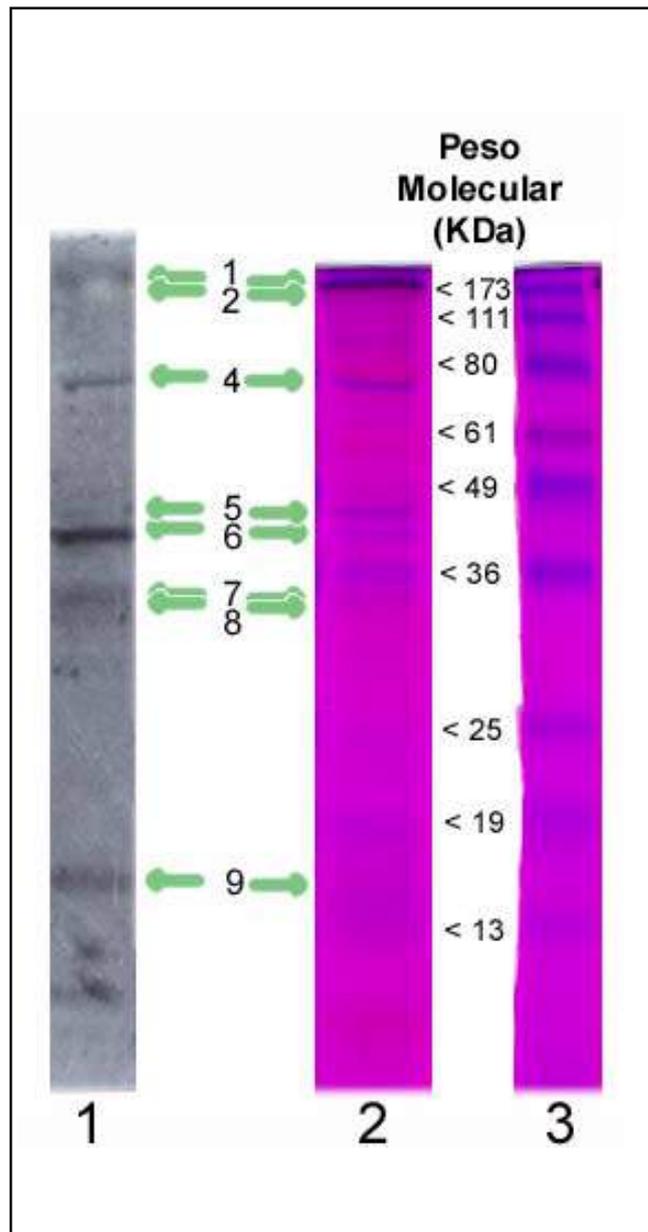


Figura 2. Detección de proteínas de unión a Ca^{2+} de bajo peso molecular en *Plasmodium falciparum*.

Se trataron extractos de proteína de *Plasmodium falciparum* con buffer muestra de Laemmli y se analizaron por SDS-PAGE en un sistema discontinuo con un gel concentrador de 4.4% acrilamida total/2.3% bisacrilamida y gel separador de 7% acrilamida total/3% bisacrilamida para separar proteínas de alto peso molecular. Los geles fueron teñidos en 0.0025% "Stains-all", 25% metanol, 7.5% formamida, 0.5 mM EGTA y 30 mM Tris/HCl pH 8.8 por 4 horas (Carril 2) o transferidos a una membrana de PVDF que fue incubada en 60 mM KCl, 5 mM MgSO_4 10 mM imidazol-HCl pH 6.8 y 1 mCi/l $^{45}\text{CaCl}_2$ y expuesta a una placa de rayos-X (Carriles 1). Para determinar los pesos moleculares se corrió un carril de marcadores de peso molecular preteñidos (BRL) (Carril 3). Los pesos moleculares indicados están dados en kiloDaltons (kDa).

Se trataron extractos de proteína de *Plasmodium falciparum* (Carriles 1 y 2) con buffer muestra de Laemmli y se analizaron por SDS-PAGE en un sistema discontinuo con un gel concentrador de 4.4% acrilamida total/2.3% bisacrilamida y gel separador de 12% acrilamida total/4% bisacrilamida para separar proteínas de bajo peso molecular. Los geles fueron teñidos en 0.0025% "Stains-all", 25% metanol, 7.5% formamida, 0.5 mM EGTA y 30 mM Tris/HCl pH 8.8 por 4 horas (Carril 2) o transferidos a una membrana de PVDF que fue incubada en 60 mM KCl, 5 mM MgSO_4 10 mM imidazol-HCl pH 6.8 y 1 mCi/l $^{45}\text{CaCl}_2$ y expuesta a una placa de rayos-X (Carril 1). Para determinar los pesos moleculares se corrió un carril de marcadores de peso molecular preteñidos (BRL) (Carril 3). Los pesos moleculares indicados están dados en kiloDaltons (kDa).

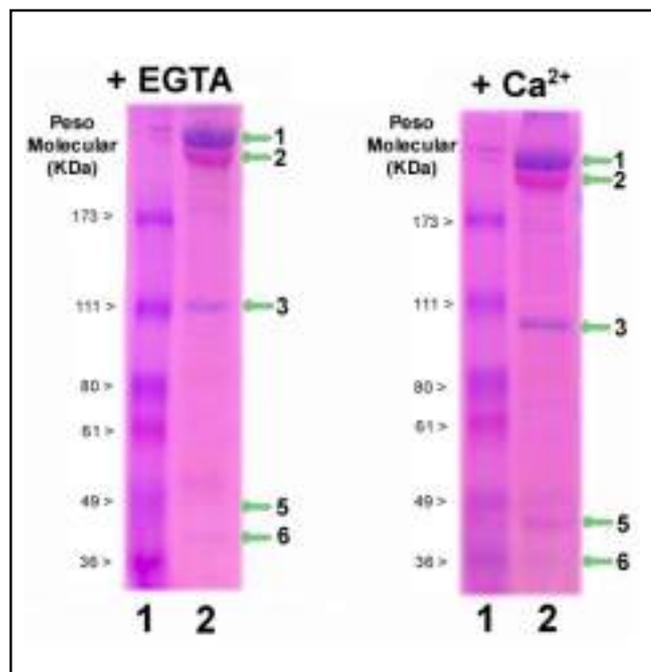


Figura 3. Migración anómala de proteínas de unión a calcio de *Plasmodium falciparum* de alto peso molecular en presencia y ausencia de calcio.

Se separaron extractos de *Plasmodium falciparum* por SDS-PAGE en un sistema discontinuo utilizando un gel separador de 7% acrilamida total/3% bisacrilamida en 0.750 M Tris-Cl, pH 8.8 con 1 mM CaCl_2 y un gel separador de 7% acrilamida total/3% bisacrilamida en 0.750 M Tris-Cl, pH 8.8 con 0.1 mM EGTA (Carril 2). Las proteínas de 398, 212, 108, 43, 40 kDa, marcadas con los números 1,2,3,5 y 6 migran más rápidamente en presencia de calcio. Los pesos moleculares indicados están dados en kiloDaltons (kDa) (Carril 1).

tes (con relación a los marcadores de peso molecular) en geles con calcio y EGTA. Esta observación proporciona evidencia experimental adicional de que éstas corresponden a proteínas de unión a calcio. También se observó un cambio en la migración de la mayoría de proteínas de unión a calcio detectadas en el extracto de eritrocitos no infectados (resultados no mostrados).

Discusión

En este estudio se lograron montar dos técnicas que en conjunto permiten definir las proteínas que unen calcio en un extracto complejo. Las bandas azules observadas en la tinción con "Stains-all" sugieren que las proteínas a las que corresponden pueden ser proteínas de unión a calcio. Sin embargo, no es posible asegurarlo, ya que se ha

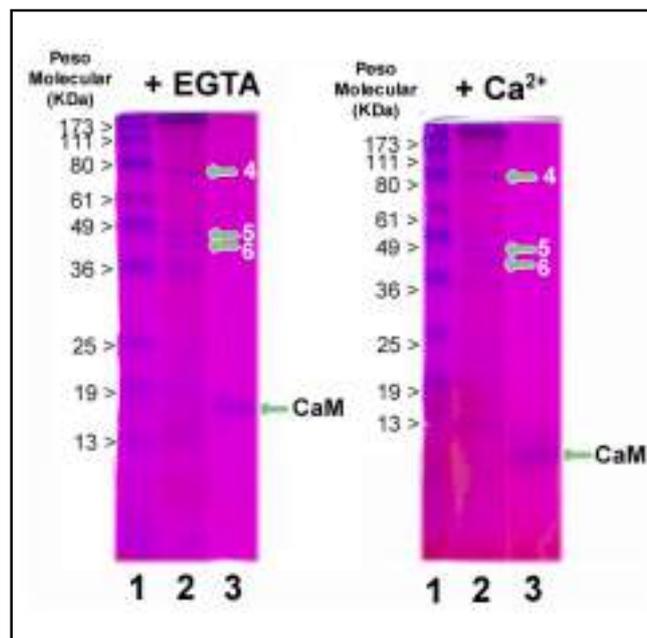


Figura 4. Migración anómala de proteínas de unión a calcio de *Plasmodium falciparum* de bajo peso molecular en presencia y ausencia de calcio.

Se separaron extractos de *Plasmodium falciparum* por SDS-PAGE en un sistema discontinuo utilizando un gel separador de 12% acrilamida total/4% bisacrilamida en 0.750 M Tris-Cl, pH 8.8 con 1 mM CaCl_2 y un gel separador de 12% acrilamida total/4% bisacrilamida en 0.750 M Tris-Cl, pH 8.8 con 0.1 mM EGTA (Carril 2). La proteína de 81 kDa, marcada con el número 4 migra más lentamente en presencia de calcio. Las proteínas de 43 y 40 kDa, marcadas con los números 5 y 6 migran más rápidamente en presencia de calcio. En el carril 3 se utilizaron 2 mg de calmodulina de testículo bovino (sigma) como control. Los pesos moleculares indicados están dados en kiloDaltons (kDa) (Carril 1).

reportado que otras clases de proteínas, como algunas sialoproteínas o glicoproteínas, también muestran una coloración azul con esta tinción. Las bandas obtenidas usando la técnica de " $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Overlay" muestran la capacidad de estas proteínas de unir calcio y representa evidencia conclusiva de que son de hecho proteínas de unión a calcio. Los resultados obtenidos usando la tinción con "Stains-all" y la técnica de " ^{45}Ca overlay" muestran un alto grado de correlación para las proteínas de unión a calcio en *Plasmodium falciparum*, ya que la mayoría de proteínas que demostraron ser capaces de unir $^{45}\text{Ca}^{2+}$, tiñeron de color azul con "Stains-all". Por lo tanto, las dos técnicas pueden ser usadas en combinación en estudios de detección y purificación de proteínas de unión a calcio en este organismo, aprovechando tanto la especificidad de la técnica de " ^{45}Ca overlay" y la economía y

sencillez de la tinción con "Stains-all". La observación de la migración diferencial en presencia y ausencia de calcio proporciona evidencia adicional de la capacidad de unir calcio de las proteínas detectadas. La migración diferencial de proteínas de unión a calcio en geles con Ca^{2+} y EGTA puede deberse a cambios conformacionales de las proteínas que alteren su movilidad en los geles.

El uso de estas dos técnicas reveló la existencia de un número de proteínas de unión a calcio presentes en el parásito intracelular *Plasmodium falciparum* con una madurez de 36 horas. Comparando con la literatura sería posible señalar tres de estas proteínas entre las reportadas anteriormente. Sin embargo, por lo menos seis no han sido registradas previamente en la literatura. Las dos proteínas con pesos moleculares mayores de 200 kDa mostradas como las bandas números 1 y 2 en la figura 1, no han sido reportadas en la literatura. Su alto peso molecular y abundancia sugiere que pueden tener un papel estructural en el parásito. Las proteínas de 109 kDa y de 43 kDa, representadas por la bandas números 3 y 5 tienen un peso que no corresponde al de ninguna proteína de unión a calcio reportada. Igualmente, las bandas números 7 y 8 representan proteínas de unión a calcio cuyos pesos no son similares a los de ninguna proteína de unión a calcio registrada en la literatura.

Por otro lado, algunas de las proteínas detectadas tienen pesos moleculares cercanos a los de proteínas reportadas en la literatura. La proteína de 81 kDa correspondiente a la banda número 4 presenta un peso molecular muy similar al de la proteína del parásito PfSub-1, una proteasa dependiente de calcio de la familia de las Subtilisinas, que se sabe tiene un papel durante la invasión del eritrocito. La proteína de 40 kDa, correspondiente a la banda número seis tiene un peso muy similar al de PFERC, una proteína de unión a calcio de la familia de las reticulocalbinas presente en el retículo endoplasmático de *Plasmodium falciparum*. La banda número nueve, que es visible sólo en las autorradiografías realizadas con ^{45}Ca y no en los geles teñidos con "Stains-all", corresponde a una proteína de unión a calcio de aproximadamente 17 kDa. Es muy posible que esta proteína sea la calmodulina del parásito, a juzgar por su peso molecular.

Existen dos proteínas de unión a calcio reportadas en la literatura que no fueron detectadas en el presente estudio: PfCPK y TCTP, con pesos moleculares de 61 y 20 kDa. Es posible que estas proteínas estén presentes en cantidad demasiado baja para ser detectadas con los métodos utilizados, o que por sus características propias o por las proteínas o estructuras a las que se unen hayan sido eliminadas en la preparación del extracto.

El número de estudios que se han hecho buscando proteínas de unión a calcio en *Plasmodium falciparum* muestra la importancia que se le da a la homeostasis de calcio en este parásito. La necesidad de calcio durante el desarrollo del parásito indica la presencia de mecanismos dependientes de calcio que son indispensables para que el parásito pueda llevar a cabo su ciclo de vida. Por esto, dichos mecanismos son prometedores blancos para el desarrollo de nuevos medicamentos. Por todo esto, el estudio de las proteínas identificadas en este trabajo, que permita determinar su estructura y función, es de gran interés dentro de este campo de la parasitología. La metodología mostrada en este estudio presenta excelentes herramientas para utilizar dentro de un eventual ensayo de purificación de las proteínas identificadas.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia y por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS, proyecto BID-Colciencias 2104-04170-95.

Bibliografía

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD.** (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1):11-21
- Bhisutthibhan J, Philbert MA, Fujioka H, Aikawa M, Meshnick SR.** (1999) The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding. *Eur J Cell Biol.* **78**(9): 665-70.
- Blackman MJ, Fujioka H, Stafford WH, Sajid M, Clough B, Fleck SL, Aikawa M, Grainger M, Hackett F.** (1998) A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J Biol Chem.* **273**(36): 23398-409.
- Campbell KP, MacLennan DH, Jorgensen AO.** (1983) Staining of the Ca^{2+} -binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all". *J Biol Chem.* **258**(18):11267-73.
- Haghighat NG, Ruben L.** (1992) Purification of novel calcium binding proteins from *Trypanosoma brucei*: properties of 22-, 24- and 38-kilodalton proteins. *Mol Biochem Parasitol.* **51**(1): 99-110.
- Krungkrai, J, Yuthavong Y** (1982) Enhanced Ca^{2+} Uptake by Mouse Erythrocytes in Malarial (*Plasmodium berghei*) Infection. *Molecular and Biochemical Parasitology* **7**, 227-235
- La Greca N, Hibbs AR, Riffkin C, Foley M, Tilley L.** (1997) Identification of an endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein with multiple EF-hand motifs in asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **89**(2): 283-93.
- Laemmli UK, Favre M.** (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol.* **80**(4):575-99.

- Maruyama K, Mikawa T, Ebashi S.** (1984) Detection of calcium binding proteins by ^{45}Ca autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *J Biochem (Tokyo)*. **95**(2): 511-9.
- Maruyama K, Nonomura Y.** (1984) High molecular weight calcium binding protein in the microsome of scallop striated muscle. *J Biochem (Tokyo)*. **96**(3): 859-70.
- Mohrle JJ, Zhao Y, Wernli B, Franklin RM, Kappes B.** (1997) Molecular cloning, characterization and localization of PfPK4, an eIF-2alpha kinase-related enzyme from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. **328** (Pt 2): 677-87.
- Robson KJ, Jennings MW.** (1991) The structure of the calmodulin gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. **46**(1): 19-34.
- Robson KJ.** (1993) Sequence diversity in the intron of the calmodulin gene from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. **60**(1): 1-8.
- Scheibel LW, Colombani PM, Hess AD, Aikawa M, Atkinson CT, Milhous WK.** (1987) Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*): implications for drug design. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(20): 7310-4.
- Tanabe, K; Doi, S** (1988): Rapid Clearance of *Plasmodium yoelii*-infected erythrocytes after exposure to the ionophore A23187. *Comp. Biochem. Physiol.* **92A**: 85-88.
- Tanabe, K; Mikkelsen, Ross B; Wallach, Donald FH** (1982): Calcium Transport of *Plasmodium chabaudi*-infected Erythrocytes. *J. Cell Biol.* **93**: 680-684.
- Trager W, Jensen JB.** (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 193(4254): 673-5.
- Wasserman, M; Alarcon, C; Mendoza, PM** (1982): Effects of Ca^{2+} on the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **31**, 711-717.
- Zhao Y, Kappes B, Franklin RM.** (1993) Gene structure and expression of an unusual protein kinase from *Plasmodium falciparum* homologous at its carboxyl terminus with the EF hand calcium-binding proteins. *J Biol Chem*. **268**(6): 4347-54.
- Zhao Y, Kappes B, Yang J, Franklin RM.** (1992) Molecular cloning, stage-specific expression and cellular distribution of a putative protein kinase from *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem*. **207**(1): 305-13.