

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Klára Charvátová**

Invaze hostitelské buňky parazitickým prvokem *Plasmodium falciparum*  
Invasion of the host cell by parasitic protist *Plasmodium falciparum*

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha, 2021

**Prohlášení:**

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

V Praze, 5.5.2021

Podpis

**Poděkování:**

Děkuji svému vedoucímu práce Mgr. Pavlovi Doležalovi Ph.D. za skvělou komunikaci, rady a veškerou pomoc. V neposlední řadě patří poděkování mému příteli za neustávající podporu.

## **Abstrakt**

*Plasmodium falciparum* je intracelulární parazit způsobující tropickou malárii. Ačkoli v našich podmínkách mírného pásu není problémem, v tropických a subtropických oblastech se jedná o závažnou zdravotní hrozbu. Onemocnění je nebezpečné zejména pro malé děti, které tvoří více než polovinu obětí. Tato práce pojednává o invazi červené krvinky merozoitem, která představuje klíčový krok životního cyklu parazita pro vlastní průběh onemocnění. Hlavní část je věnována proteinům sekretovaným z organel invazivního aparátu buňky plasmodia, které předchází část obsahující základní informace o *P. falciparum* a malárii. Závěr práce je doplněn o kapitolu o úniku parazita z červené krvinky.

## **Klíčová slova**

Invaze, plasmodium, parazit, merozoit, červená krvinka, těsný spoj, klouzavý pohyb, apikální komplex, mikronémy, rhoptrie

## **Abstract**

*Plasmodium falciparum* is an intracellular parasite that causes tropical malaria. Although plasmodium is not a problem in the middle latitudes, in tropical and subtropical regions it poses a great health threat. This specifically concerns little children, which constitute more than a half of the victims. This thesis discusses the invasion of the red blood cell by a merozoite, which is a key step of the parasite life cycle responsible for the disease development. The main part of the thesis deals with proteins secreted by organelles of the invasive apparatus of plasmodium cell. It is preceded by a chapter introducing basic information on *P. falciparum* and malaria. The end of the thesis contains a chapter on the parasite exit from the red blood cell.

## **Key words**

Invasion, plasmodium, parasite, merozoite, red blood cell, tight junction, gliding motility, apical complex, micronemes, rhoptries

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. <i>Plasmodium falciparum</i> .....	2
2.1. Zařazení v systému.....	2
2.2. Životní stádia.....	2
2.3. Životní cyklus.....	2
2.4. Malárie .....	4
2.4.1. Léčba, terapie, vakcinace a eradikace .....	4
3. Obecný náhled na invazi .....	7
4. Invazivní aparát <i>P. falciparum</i> .....	9
4.1. Apikální komplex.....	9
4.1.1 Konoid.....	9
4.1.2. Mikronémy.....	10
4.1.3. Rhoptrie.....	13
4.1.4. Denzní granule .....	15
4.2. Klouzavý pohyb .....	16
4.3. Povrchové proteiny merozoita .....	18
5. Únik z červené krvinky .....	20
6. Závěr.....	22
7. Seznam použité literatury.....	23

## Seznam používaných zkratek

AMA-1	Apical membrane antigen 1
ATP	Adenosin trifosfát
clag	Cytoadherence-linked asexual gene
CDPK1	Ca <sup>2+</sup> -dependent protein kinase 1
CR1	Complement receptor 1
CSP	Circumsporozoite protein
EBA	Erythrocyte-binding antigen
EBL	Erythrocyte-binding ligand
GAP	Gliding-associated protein
GM	Genetická modifikace
GPI	Glykosyl fosfatidyl inositol
IMC	Inner membrane complex
MSP	Merozoite surface protein
MTIP	Myosin A tail domain-interacting protein
MTRAP	Merozoit thrombospondin-related anonymous protein
PTEX	Plasmodium Translocon of Exported proteins
RALP	Rhoptry-associated leucine zipper-like protein 1
RAMA	Rhoptry-associated membrane antigen
RAP	Rhoptry-associated proteins
RBP	Reticulocyte-binding protein
RESA	Ring-infected erythrocyte surface antigen
Rh	Reticulocyte-binding protein homologue
RhopH	Rhoptry heavy
RON	Rhoptry neck proteins
SUB	Subtilisin-like protease
WHO	Světová zdravotnická organizace

# 1. Úvod

*Plasmodium* patří mezi nejvýznamnější intracelulární parazity. Jedná se o jednobuněčný organismus napadající buňky obratlovců i bezobratlých. Tato práce pojednává o druhu *P. falciparum*, jehož hmyzím hostitelem je komár rodu *Anopheles*, který zprostředkovává přenos parazita do lidského těla. *P. falciparum* je také původcem tropické malárie, která se v případě špatné či žádné léčby může vyvinout v těžkou komplikovanou malárii (Cowman et al., 2016). Zároveň je tento druh zodpovědný za největší počet úmrtí na malárii, přičemž nejohroženějšími jedinci jsou děti do věku 5 let.

Během svého životního cyklu *P. falciparum* invaduje tři různé buněčné typy hostitele ve třech různých životních stádiích. Jako sporozoit se v lidském organismu dostává do hepatocytů, odkud ve formě merozoita napadá červené krvinky člověka a poté již v komářímu vektoru se ve stádiu ookinetu dále vyvíjí v buňkách středního střeva. Přestože invaze červené krvinky zabírá v životě *P. falciparum* pouze zlomek času, jedná se o klíčový krok v životním cyklu parazita, který umožňuje úspěšné ustanovení infekce v krevním oběhu hostitele. Pro člověka je pak toto chování parazita zodpovědné za vlastní projevy a míru závažnosti onemocnění (Milner, 2018).

Cílem této bakalářské práce je shrnutí prozkoumaných poznatků o invazi *P. falciparum* do červených krvinek. Tato práce představuje invazivní aparát parazita, zaměřuje se na sekretované molekuly a popisuje jejich roli, kterou mají v invazi hostitelské buňky.

## 2. *Plasmodium falciparum*

### 2.1. Zařazení v systému

*Plasmodium falciparum* je intracelulární parazit patřící do třídy Haematozoa pod kmenem Apicomplexa. Jedná se o jednoho ze šesti druhů parazitů způsobujících malárii v lidském těle (Milner, 2018). Mezi dalších pět patří: *P. vivax*, *P. ovale wallickeri*, *P. ovale curtisi*, *P. malariae* a *P. knowlesi*. Z těchto druhů jsou největšími hrozbami *P. vivax* a *P. falciparum*, přičemž *P. falciparum* je považované za nejvíce letální a *P. vivax* je geograficky nejrozšířenější a je největší příčinou onemocnění malárií (Cowman et al., 2016).

### 2.2. Životní stádia

Životní cyklus plasmodia se skládá ze čtyř životních stádií, která se liší svou funkcí i morfologií: sporozoit, merozoit, trofozoit a gametocyt. Společně tato stádia sdílí pouze 6% exprimovaných proteinů, přičemž nejvíce unikátních sekvencí kóduje forma sporozoita, a to téměř polovinu (Florens et al., 2002).

Sporozoiti jsou do těla lidského hostitele vstříknuti komárem. Jsou specializovaní na invazi hepatocytů. Během několika hodin po infekci se dostávají do jater, kde invadují hostitelské buňky, diferencují se do schizontů, jež generují tisíce merozoitů (Soulard et al., 2015).

Merozoiti jsou stádiem vstupujícím do červených krvinek. Po invazi vytváří parazitoformní vakuolu, ve které se mění na stádium trofozoita. Trofozoit, jehož časné stádium nabývá tvar prstýnku, ztrácí invazní aparát a postupně zvětšuje svůj objem. Takto infikované krvinky však nejsou zvětšené. Trofozoit se mění na schizonta, který řadou asynchronních mitotických dělení vytvoří dceřiné merozoity. Během vývoje v červené krvince se mění exprese více než 80% genů (Bozdech et al., 2003).

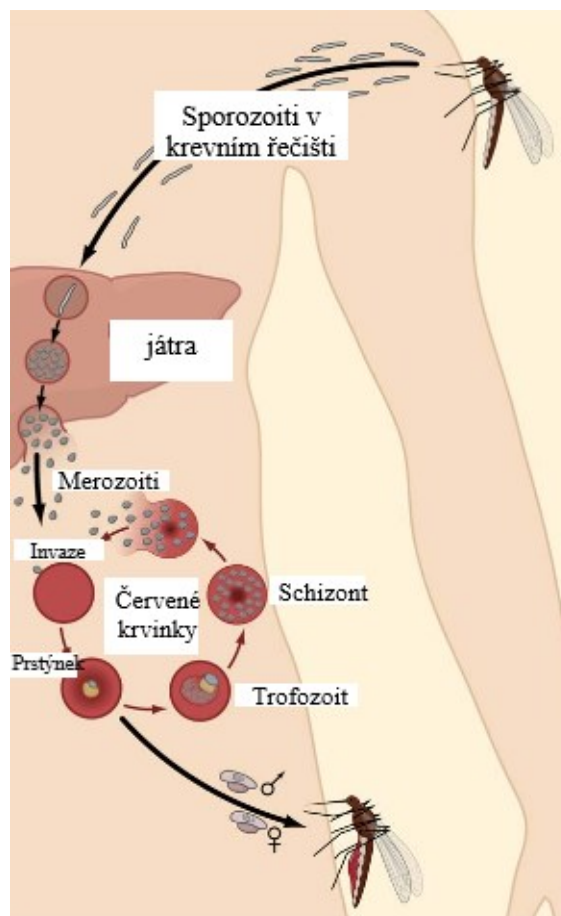
Gametocyty mají fazolovitý tvar a mohou být buď samčí nebo samičí. Diferencují se z merozoitů uvnitř červených krvinek a jejich další vývoj je iniciován až vstupem do komářího vektoru (Florens et al., 2002).

### 2.3. Životní cyklus

*P. falciparum* má komplexní životní cyklus. Vektorem a zároveň definitivním hostitelem je komár z rodu *Anopheles*. Mezihostitelem se stane infikovaný člověk, ve kterém se parazit vyskytuje zprvu v hepatocytech a posléze v červených krvinkách (Obr. 1).

Do lidského hostitele probíhá vstup plasmodia ve formě sporozoitů během krve sání infekční komáří samičkou. Sporozoiti se tak dostávají do podkožního tkáně nebo přímo do krevního řečiště, což je ovšem méně častá varianta (Miller et al., 2002). Odsud se přemísťují do hepatocytů, přičemž prochází skrz několik buněk, než najdou vhodnou cílovou, ve které se dále vyvíjí a prolifерují (Mota et al., 2001). K přechodu z krevního oběhu do jaterní tkáně využívají endoteliální buňky či Kupfferovy buňky, kterými rovněž procházejí díky unikátnímu způsobu invaze (Tavares et al., 2013). V hepatocytech probíhá proces buněčného dělení tzv. schizogonie, který dává z jednoho sporozoita vzniknout deseti tisícům buněk dalšího stádia tzv. merozoitů (Sturm & Heussler, 2007).

Tito merozoiti poté musí překonat bariéru hostitelské buňky a endotelu, aby se dostali do krevního řečiště. Merozoiti posléze vstupují do červených krvinek, kde probíhá hlavní a pro člověka nejdůležitější část životního cyklu plasmodia. Uvnitř červených krvinek se merozoiti podrobují asexuálnímu rozmnožovacímu cyklu, vzniká z nich schizont, ze kterého se poté zformují další dceřiní merozoiti, přičemž malá část z těchto parazitů se vyvíjí do samčích a samičích gametocytů (Meibalan & Marti, 2017).



Obrázek 1: Životní cyklus *P. falciparum* v lidském hostiteli. Na obrázku lze vidět sporozoity a poté stádia vyskytujících se v červených krvinkách. Převzato z: (Cowman & Crabb, 2006). Upraveno.

Sexuální cyklus zahrnuje tři fáze, z nichž první je gametocytogeneze - již zmíněná produkce gametocytů probíhající v krevním řečišti preferovaně v perifériích lidského těla. Druhým krokem je gametogeneze, která zahrnuje tvorbu haploidních gamet ve středním střevě vektora. Posledním je fúze těchto gamet za vzniku diploidní zygoty (Sinden, 1983).

Během 24 hodin se zygota přemění v ookinet, který je schopen pohybu a formuje se v oocystu, kterou po několika dnech opouští tisíce sporozoitů připravených k infekci člověka (Siciliano et al., 2020).

## **2.4. Malárie**

Malárie je onemocnění vyvolané obecně rodem *Plasmodium*. V roce 2019 bylo potvrzeno 229 milionů nových infekcí, této nemoci v témže roce podlehl minimálně 409 tisíc lidí, z čehož dvě třetiny zemřelých nedovršily pěti let života. Necelá polovina obyvatel světa byla v ohrožení nakažením (WHO). Druh *P. falciparum* je přítomen především na území afrického kontinentu, kde způsobuje až 70% onemocnění, nejzasáženějším regionem jsou země Sub-saharské Afriky. V roce 2002 bylo přibližně 25% nákaz zaznamenáno v jihovýchodní Asii (Snow et al., 2005). Geograficky se dá říct, že ohniskem jsou především oblasti tropického a subtropického pásu (Gallup & Sachs, 2001).

Malarické symptomy se objevují až po přechodu merozoitů z jater do krevního řečiště a jejich invazi do červených krvinek (Milner, 2018). Mezi nespecifické příznaky provázející nekomplikovanou malárii patří bolesti hlavy a svalů, nevolnosti nebo nepřetržitá teplota vyšší než 37,5 °C. Rychlá odpovídající léčba v případě *P. falciparum* infekci zcela vymýtí. Pokud se pacient nedoléčí či neléčí, může nemoc přejít v těžkou komplikovanou malárii (Cowman et al., 2016).

Komplikovaná malárie ohrožuje nejvíce malé děti do věku pěti let. Tyto děti trápí kóma, obtíže s dýcháním nebo těžká anémie (Marsh et al., 1995). V některých případech těžké malárie a u těhotných žen se může vyvinout hypoglykémie (White et al., 1983). Dalším příznakem může být plicní edém, vysoké horečky nad 40°C, křeče, vyčerpání, hypertenze, krvácení, selhání ledvin či poškození více orgánů (Bartoloni & Zammarchi, 2012).

### **2.4.1. Léčba, terapie, vakcinace a eradikace**

Malárie je léčitelné onemocnění. Hlavním faktorem vyléčení pacienta je včasná diagnóza, použité antimalarikum a úroveň rezistence vůči léku (Bousema & Drakeley, 2011). V současné době je podle WHO nejlepší možností kombinovaná terapie založená na

artemisininu a jeho derivátech (WHO). Dalšími rozšířenými léky jsou chlorochin, pyrimethamin a sulfadoxin. Rezistence vůči těmto lékům se liší napříč životními stádii. Rané formy trofozoitů a pozdní schizonti se ukázaly jako nejvíce odolní. Oproti tomu trofozoiti vykazovali největší citlivost vůči látkám zabraňujícím glykolýze a proteosyntéze (Terkuile et al., 1993).

Artemisinin je seskviterpen endoperoxid, který je získáván z rostliny *Artemisia annua* (pelyněk roční). V Číně s ním lidé tradičně léčili různorodé horečky. Jako antimalarika se užívají i jeho deriváty: artemether, artether a artesunát. V průběhu metabolismu všechny končí u stejného aktivního produktu – dihydroartemisininu (Ridley, 2002). V mechanismu jeho účinku je důležitá přítomnost atomu železa v buňce, díky němuž se z artemisininu generuje volný radikál či jejich směs. Radikály poté způsobují poškození a akumulují se v potravní vakuole plasmodia, což vede ke smrti buňky (Meshnick et al., 1993). Nicméně již byly zveřejněny studie z Kambodži, které upozorňují na sníženou citlivost *P. falciparum* vůči artemisininu a jeho derivátům (Dondorp et al., 2009). V rané fázi života parazita uvnitř červené krvinky dochází ke zpomalení endocytózy a tvorbě tzv. cytotomu, což jsou struktury na povrchu parazita připojené k cytoplazmě krvinky (Bakar et al., 2010). Díky tomu je snížen příjem hemoglobinu a v něm vázaného iontu železa, čímž je zřejmě způsobena rezistence k artemisininu (Xie et al., 2020).

Chlorochin je syntetický derivát chininu, který je získáván z kůry chinovníku (*Cinchona*). Účinek chlorochinu je dán jeho bazickým charakterem, který inhibuje polymerizaci hematinu (oxidované formy hemové skupiny hemoglobinu) v potravní vakuole, a to vede k zastavení růstu parazita (Dorn et al., 1998). Bezpečnost, účinnost, stabilita, nízká cena a snadná výroba vedla k jeho širokému rozšíření a stal se nejpoužívanějším lékem proti malárii (Slater, 1993). V současné době již tento lék není využíván kvůli rezistenci ve všech oblastech výskytu *P. falciparum* (Peters, 1998).

První a zatím jedinou aplikovanou vakcínou je RTS,S. Vakcína obsahuje značnou část proteinu CSP (circumsporozoite protein), jehož prostřednictvím je umožněn pohyb sporozoita a jeho průchod do hepatocytu (Tewari et al., 2002). Další částí je povrchový antigen z viru hepatitidy B, který umožňuje skládání do tvaru virových partikulí. Vakcína je využívána v Ghaně, Keni a Malawi prostřednictvím programu Světové zdravotnické organizace (WHO). Testy na dětech ukázaly její účinnost proti *P. falciparum* i bezpečnost pro lidské tělo (Alonso et al., 2004).

Další z možností vymýcení malárie je dohled nad vektorem – jeho genetická modifikace (GM). Aby se tato varianta stala účinnou, musí se takto upraveným komárům dařit v přirozeném prostředí a konkurovat svým nemodifikovaným protějškům (Tuteja, 2007). Ve vývoji a účinnosti GM komárů hraje podle (Ito et al., 2002) také důležitou roli bezpečná metoda šíření cizího genu v populaci komárů a úprava více genů, které by blokovaly vývoj plasmodia různými mechanismy. Jako velice slibný přístup se jeví využití technologie „gene drive“, která umožňuje rychlé šíření GM napříč populací komárů (Hoermann et al., 2021). Tato metoda spočívá ve změně pravděpodobnosti přenesení konkrétní alely jedince na potomka. Jedná se však o riskantní krok, který může mít nečekané důsledky během aplikace ve volné přírodě.

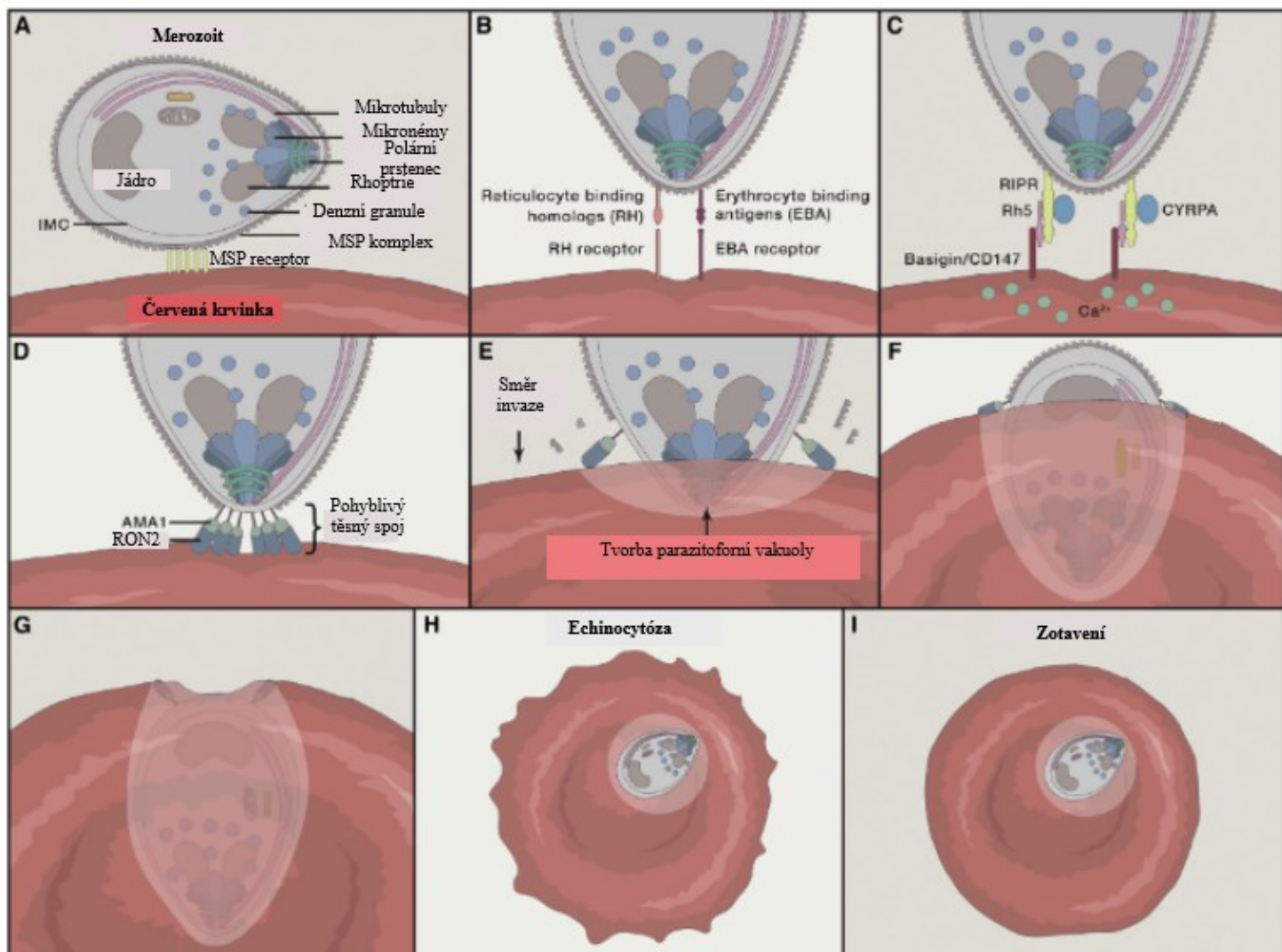
### 3. Obecný náhled na invazi

Vstup do červených krvinek vždy probíhá ve stádiu merozoita. Krok invaze je velmi účinný a rychlý – extracelulární stádium je tak pouze na minimum času vystaveno imunitnímu systému hostitele (Cowman & Crabb, 2006).

Celý proces invaze červené krvinky lze rozdělit do tří fází – preinvazivní, invazivní a postinvazivní. První část začíná v momentě prvního kontaktu merozoita a plazmatické membrány červené krvinky. Tento kontakt probíhá na jakémkoli místě na povrchu parazita (Obr. 2). Merozoit je poté reorientován směrem kolmo ke krvinece svým anteriorním koncem, který obsahuje pro invazi esenciální organely apikálního komplexu (Dvorak et al., 1975) (Obr. 2). V místě kontaktu je krvinka deformována. Úroveň této deformace se však liší – ve studii Gilsona a Crabba se někdy objevily krvinky, u kterých byl tento jev sotva rozpoznatelný. Po vyvolání deformace krvinky se stále ještě může merozoit od hostitelské buňky odpojit (Gilson & Crabb, 2009).

Reorientace merozoita umožňuje vzájemnou interakci hostitelské buňky a parazita na krátkou vzdálenost. Ve fázi merozoita se mezi parazitem a červenou krvinekou tvoří prostřednictvím interakcí proteinů mikroném a rhoptrií komplex známý jako pohyblivý těsný spoj (Cao et al., 2009) (Obr. 2). Tento spoj udržuje membránu červené krvinky a parazita na vzdálenost přibližně 10 nm. Těsný spoj se poté pohybuje okolo povrchu merozoita až k jeho posteriorní straně, přičemž se merozoit dostává celý do hostitelské buňky (Aikawa et al., 1978), čímž končí druhá, tedy invazivní, fáze (Obr. 2). Pohyb těsného spoje vyžaduje funkci aktino-myosinového motoru (Sibley et al., 1998).

Ve chvíli, kdy je merozoit celý uvnitř červené krvinky, podléhá krvinka opět deformaci tzv. echinocytóze (Obr. 2). Krvinka ztrácí svůj bikonkávní tvar. Děje se tak díky odtoku draselných a chloridových iontů, jehož důsledkem je zároveň ztráta vody (Gilson & Crabb, 2009). Po několika minutách se krvinece vrací její běžný tvar (Obr. 2). Merozoit si uvnitř červené krvinky vytváří především pomocí proteinů sekretovaných z rhoptrií a denzních granulí parazitoformní vakuolu, která mu poskytuje vhodné podmínky pro další vývoj a chrání ho před prostředím hostitelské buňky.



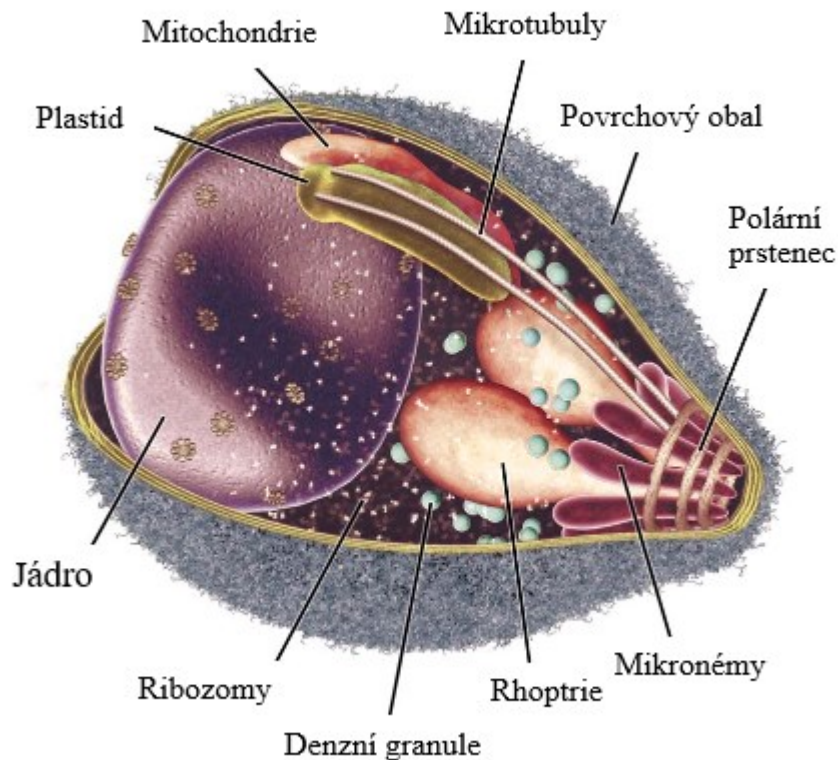
Obrázek 2: Zobrazení invaze červené krvinky merozoitem: A: Neorientované přichycení pomocí MSP proteinů, B: Reorientace merozoita apikálním koncem k membráně červené krvinky, C: Interakce molekul parazita s receptory na červené krvince, D: Tvorba pohyblivého těsného spoje, E: Tvorba parazitoforní vakuoly, F: Pohyb těsného spoje podél povrchu merozoita, G: Těsný spoj je na posteriorním konci parazita, H: Echinocytóza červené krvinky po celkové invazi merozoita, I: Následné zotavení tvaru červené krvinky. Převzato z: (Cowman et al., 2016). Upraveno.

## 4. Invazivní aparát *P. falciparum*

Za invazivní aparát *P. falciparum* se považuje apikální komplex, který je lokalizován na anteriorní straně merozoita a IMC (Inner Membrane Complex), jenž se vyskytuje pod plazmatickou membránou merozoita.

### 4.1. Apikální komplex

Do apikálního komplexu obecně patří konoid jako strukturální organela a zároveň i sekreční organely – mikronémy, rhoptrie a denzní granule (Obr. 3). Všechny tyto sekreční organely hrají roli při vývoji *P. falciparum*, a především jsou esenciální v jeho invazi do hostitelských buněk. Druhy *Plasmodium* však konoid nemají, jelikož patří do skupiny Aconosea, která je typická nepřítomností konoidu.



Obrázek 3: Na obrázku je stavba buňky merozoita, lze vidět morfologii sekrečních organel a jejich lokalizaci na apikálním pólu parazita. Převzato z: (Cowman & Crabb, 2006). Upraveno.

#### 4.1.1 Konoid

Konoid je organela vyskytující se na anteriorním konci parazita napříč rodem Apicomplexa s výjimkou skupiny Aconosea, do které spadá i *P. falciparum*. Jeho funkce je neznámá, při invazi se rozšiřuje a zaujímá tvar náprstku (Carey et al., 2004). Jeho struktura je

založena na tubulinu, který se ovšem liší od tubulinu obsaženého v mikrotubulech organizací protofilament. K sestavování dceřiného konoidu dochází de novo a bez potřeby templátu (Hu et al., 2002). Tyto studie proběhly na jiném organismu z kmene Apicomplexa – přesněji na *Toxoplasma gondii*.

#### 4.1.2. Mikronémy

Mikronémy jsou malé organely oválného tvaru. Každý merozoit jich má kolem 40. Jsou formovány během doby, kdy merozoiti pučí ze schizonta. Zároveň jsou ve stejném časovém rozmezí pomocí mikrotubulární sítě lokalizovány na anteriorním okraji parazita (Bannister et al., 2003) a sekretují proteiny na jeho povrch. Po sekreci se tyto proteiny pomocí aktino-myosinového motoru rozšiřují i k posteriorní straně povrchu. Mezi tyto proteiny patří AMA-1, EBA-175, EBA-140, EBA-181, EBL1, MTRAP a SUB2.

Vystavení parazita prostředí o nízké koncentraci draselných iontů, jakým je krevní plazma, vede ke zvýšení vnitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů v buňce parazita a následné sekreci výše uvedených efektorových proteinů. Samotný přechod do krevní plazmy tak automaticky spouští sekreci proteinů EBA-175 a AMA-1 z mikroném na povrch parazita (Singh et al., 2010).

EBA-175 (erythrocyte-binding antigen 175) se, jak už z názvu vyplývá, váže na červenou krvinku. Vazba probíhá prostřednictvím sialové kyseliny na receptoru červené krvinky – glykoforinu A (Sim et al., 1994) (Obr. 4), který je nejběžnějším receptorem na povrchu krvinek. Glykoforin A má strukturu transmembránového dimeru se dvěma vysoce glykosylovanými doménami, které směřují do extracelulárního prostoru. Na EBA-175 bylo rozpoznáno celkem šest vazebných míst pro glykan. S glykoforinem interaguje ve formě dimeru. Vazebná oblast obsahuje dvě podobné domény bohaté na cystein - F1 a F2, přičemž F2 zprostředkovává většinu kontaktů s glykany (Tolia et al., 2005). Cytoplazmatická část tohoto proteinu, oblast bohatá na cystein a transmembránová doména jsou esenciální pro funkční invazi merozoita do červených krvinek. Při výzkumu mutantních merozoitů, kteří měli zkrácený protein EBA-175 o tyto části byla objevena dráha nezávislá na sialové kyselině. V této dráze je předpokládáno zapojení jiného ligandu, který se váže k červeným krvinkám (Duraisingh et al., 2003). Interakce mezi proteinem EBA-175 a jeho receptorem glykoforinem A vede k obnovení výchozí koncentrace vápenatých iontů v plasmodiu. Tato změna spouští postupnou sekreci proteinů z rhoptrií – nejprve z užší části rhoptrií tzv. krčku

(rhoptry neck), následně díky signálům z krčku i z širší části tzv. rhoptry bulb (Singh et al., 2010).

EBA-140 (Erythrocyte-binding antigen 140) má podobnou celkovou strukturu jako EBA-175. Domény F1 a F2 mají odlišnou funkci, přičemž F1 se dostává do kontaktu s receptorem, kterým je glykoforin C (Obr. 4). Interakce probíhá taktéž přes sialovou kyselinu (Jaskiewicz et al., 2019). EBA-181 (Erythrocyte-binding antigen 181) je dalším z proteinů rodiny vážících se na červené krvinky (ebl). I zde je vazba zprostředkována kyselinou sialovou. Receptorem však není glykoforin A, B ani C, nicméně jiný sialoglykoprotein na povrchu krvinek (Gilberger et al., 2003) (Obr. 4). Zároveň tento protein interaguje s doménou proteinu 4.1, který je součástí skeletu červené krvinky. Tento kontakt by mohl zamezit opravnému mechanismu na membráně krvinky (Lanzillotti & Coetzer, 2006) a tím umožnit snadnější vstup celému merozoitovi.

EBL-1 (erythrocyte-binding ligand 1) je díky podobnosti s ostatními proteiny vázajícími červené krvinky považován za další z možností, jak se *P. falciparum* dostává do hostitelské buňky (D. S. Peterson et al., 1995). Od ostatních genů z rodiny ebl se liší v 3'-oblasti genu, kam je vloženo 5 tymidinů, které vedou ke změně čtecího rámce. Jeho exprese probíhá pouze ve stádiu schizonta. EBL-1 se váže na glykoforin B (Obr. 4). K vazbě jsou potřeba obě domény F1 a F2 (Mayer et al., 2009), přičemž hlavní vazebné místo se nachází na segmentu domény F2 a má délku 69 aminokyselin (Li et al., 2012).

MTRAP (merozoit thrombospondin-related anonymous protein) je homolog TRAP proteinů, které hrají roli v invazi sporozoitů a ookinetu. Je sekretován na povrch buňky v oblasti apikálního komplexu ve stádiu schizonta a uvolněného merozoita. Membránová topologie proteinu MTRAP umožňuje jeho interakce na obou stranách cytoplazmatické membrány. Jeho cytoplazmatická část proteinu je v interakci s aldolázou merozoita (Baum et al., 2006), jejíž funkce je zde strukturní, zatímco extracelulární TSR doména se podílí na vazbě na červenou krvinku v prvotní interakci parazita a hostitelské buňky (Uchime et al., 2012). Receptorem na krvince pro MTRAP je homodimer Semaphorinu-7A (Bartholdson et al., 2012) (Obr. 4). Interakce s aldolázou zprostředkovává spojení mezi cytoskeletem parazita a doménami proteinů vážících se na receptory červených krvinek (Jewett & Sibley, 2003). MTRAP je tedy součástí pohyblivého těsného spoje.

SUB-2 (Subtilisin-like protease 2) je serinová proteáza sekretovaná z mikroném. Ačkoli její sekrece na povrch probíhá v anteriorní části v apikálním komplexu, proteáza je

posléze translokována na opačný posteriorní konec. Tento přesun je závislý na aktinu. SUB-2 štěpí AMA-1 i MSP-1, čímž odstraňuje komplexy mezi parazitem a hostitelskou buňkou po parazitově invazi (P. K. Harris et al., 2005). Zbytky těchto proteinů zůstávají v extracelulárním prostředí. Sestřihové místo pro AMA-1 není dáno sekvencí aminokyselin, nicméně primárně vzdáleností od transmembránové domény tohoto proteinu (Olivieri et al., 2011).

AMA-1 (Apical membrane antigen 1) neboli PF83 je pro invazi klíčový protein, který je sekretován na povrch merozoita ve chvíli, kdy probíhá uvolňování merozoitů ze schizonta (M. G. Peterson et al., 1989). Jedná se o jeden z nejprozkoumanějších proteinů *P. falciparum* a zároveň o jednoho z nejžhavějších kandidátů pro vývoj účinné anti-malarické vakcíny. Některé vlastnosti tohoto proteinu jsou konzervovány napříč rodem *Plasmodium*, v délce aminokyselinové sekvence se však mohou lišit – homolog PK66 u *P. knowlesi* je výrazně kratší než AMA-1 *P. falciparum*. Sdílí pouze kolem 55% aminokyselinové sekvence (Waters et al., 1990). Přibližně 15 minut po syntéze je protein AMA-1 štěpen na 66-kDa molekulu. Takto upravená molekula může být distribuována po celém povrchu merozoita (Narum & Thomas, 1994). AMA-1 je tvořena cytoplazmatickou částí, transmembránovou doménou a ektodoménou, tedy částí proteinu vyčnívající do extracelulárního prostoru. Tato ektodoména je rozdělena na subdoménu I, II a III, přičemž každou z nich charakterizuje určitý počet intramolekulárních cysteinových spojení (3-2-3) (Hodder et al., 1996). Zároveň se na ektodoméně nachází hydrofobní žlábk. S tímto žlábkem interagují proteiny sekretované z krčku rhoptrií – RON2 a RON4, jenž jsou součástí tzv. RON komplexu (Obr. 4). Proteiny z RON komplexu jsou přemístěny na membránu červené krvinky, přičemž většina proteinu je exponovaná do lumen krvinky (Riglar et al., 2011). RON2 k vazbě na AMA-1 využívá převážně oblasti bohaté na cystein, které jsou v *P. falciparum* vysoce konzervované (Hossain et al., 2012). Právě mezi těmito oblastmi se dle studie (Lamarque et al., 2011) nachází strukturální smyčka obsahující dva cysteiny, umožňující tvorbu vazby s hydrofobním žlábkem AMA-1. Interakce probíhá po reorientaci merozoita apikálním koncem k červené krvince a jejím prostřednictvím je tvořen pohyblivý těsný spoj mezi merozoitem a hostitelskou buňkou (Cao et al., 2009). Vytvořením spoje se spouští sekrece z širší části rhoptrií (Riglar et al., 2011). Tento spoj poté prostřednictvím aktino-myosinového motoru migruje přes celý povrch parazita, čehož důsledkem je celková invaze do hostitelské buňky (Sibley et al., 1998). AMA-1 je nakonec štěpena proteázou SUB2, která je taktéž sekretovaná z mikroném, jak bylo zmíněno v předchozím odstavci. Proto také není AMA-1 detekovatelná ve stádiu trofozoita

neboli prstýnku uvnitř červené krvinky (Crewther et al., 1990). Při inhibici AMA-1 byl identifikován R1 peptid, který je schopen se taktéž navázat na hydrofobní zlábk a tím zablockovat tvorbu pohyblivého těsného spoje a v důsledku toho i invazi merozoita do červené krvinky (K. S. Harris et al., 2005).

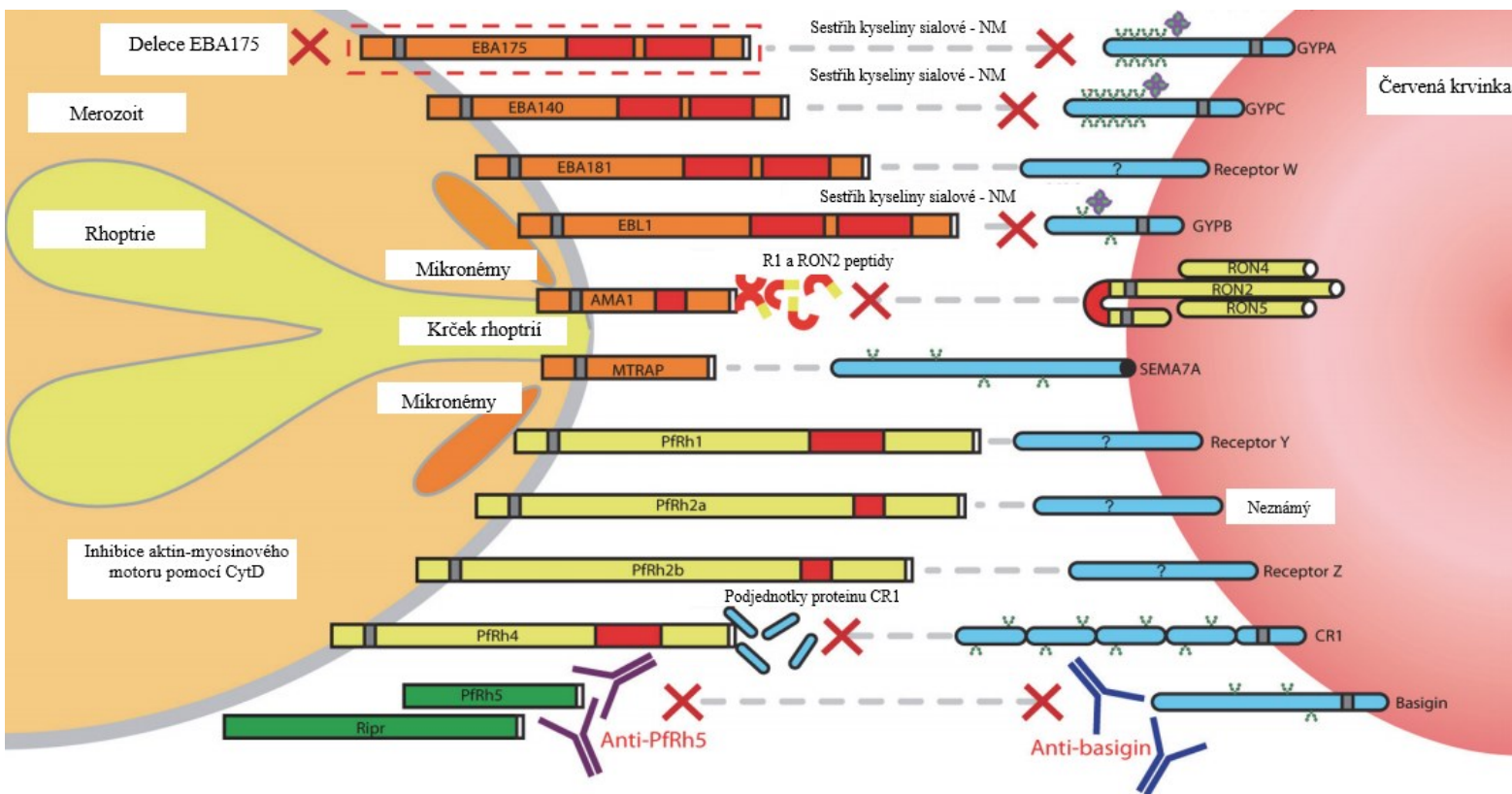
### 4.1.3. Rhoptrie

Rhoptrie jsou největší sekreční organely patřící do apikálního komplexu. V merozoitech se vyskytují v páru. Mají žárovkovitý tvar, přičemž úzká část nazývaná se krček je spojena s apikálním pólem merozoita. Tato část produkuje pro invazi nepostradatelné proteiny rodiny RON (rhoptry neck proteins). Široká část oproti tomu obsahuje proteiny RAP (rhoptry-associated proteins) podílející se na formování parazitoforní vakuoly.

RON komplex interagující s proteinem AMA-1 je sekretován z krčku rhoptrií a sestává z následujících proteinů: RON2 s přímou vazbou na AMA-1 (Cao et al., 2009), RON4 (Lebrun et al., 2005) a RON5 (Curtidor et al., 2011). Proteiny RON komplexu jsou dosud neznámým mechanismem translokovány do cytoplazmatické membrány červené krvinky (Besteiro et al., 2009), přičemž větší část proteinů je exponovaná do její cytoplazmy. RON2 se pomocí C-koncové části, ve které je větší frekvence aminokyseliny cysteinu, váže na červené krvinky přes dosud neznámý receptor (Hossain et al., 2012). Zároveň interaguje s proteinem AMA-1, jak již bylo popsáno v kapitole mikronémy. Dalšími RON proteiny, které se však nepočítají jako součást RON komplexu, jsou RON3, RON6 a RON12. Ačkoli byl protein RON3 považován za protein krčku rhoptrií, jeho lokalizace koreluje s RAP1 (tedy s „rhoptry bulb“). RON3 interaguje během invaze s RON2 a RON4, žádný kontakt však nebyl detekován s AMA-1. Po invazi merozoita se nachází v parazitoforní vakuole (Ito et al., 2011). Proteiny RON6 (Proellocks et al., 2009) i RON12 (Knuepfer et al., 2014) jsou v merozoitech přítomny na apikálním konci, ve stádiu časného trofozoita už jsou však transportovány do parazitoforní vakuoly.

Jinou rodinou proteinů vyskytujících se v krčku rhoptrií jsou tzv. Rh (reticulocyte-binding protein homologue) proteiny (Obr. 4). Jsou takto klasifikované podle podobnosti s RBPs (reticulocyte-binding proteins) v *P. vivax*. Mezi členy této rodiny patří: Rh1, Rh2a, Rh2b, Rh3, Rh4 a Rh5. Jejich funkce je v kooperaci s ebl proteiny (Lopaticki et al., 2011), váží se k receptorům červené krvinky a jsou sekretovány ještě před vytvořením těsného spoje. Vazba Rh1 je závislá na sialové kyselině (Triglia et al., 2005), přesný receptor je však neznámý. Gen pro Rh3 je považován za pseudogen, který je ve fázi schizonta transkribován,

nýbrž nedochází ke tvorbě proteinu (Taylor et al., 2001). Pro protein Rh4 bylo zjištěno, že jeho vazba je nezávislá na přítomnosti sialové kyseliny. Rh4 se totiž specificky váže na CR1 (complement receptor 1) (Tham et al., 2010). Rh5 je ligandem pro receptor basigin, který patří mezi imunoglobuliny hostitelské buňky (Crosnier et al., 2011).



Obrázek 4: Schéma molekul merozoita vážících se na různé receptory červené krvinky včetně metod, dle kterých byly receptory objeveny. (NM = neuroaminidáza, CytD = cytochalasin D) Převzato z: (Weiss et al., 2015). Upraveno.

RALP1 (Rhoptry-associated leucine zipper-like protein 1) je dalším z proteinů sekretovaných krčkem rhoptrií. Je přítomen v pohyblivém těsném spoji, jeho lokalizace odpovídá proteinu RON4, není však v asociaci s AMA-1 (Ito et al., 2013).

RAP1, RAP2 a RAP3 jsou součástí tzv. RAP komplexu lokalizovaného v části rhoptry bulb (Baldi et al., 2002). Komplex vzniká napojením v lumen Golgiho aparátu po kontaktu RAP1 s proteinem RAMA, jehož prostřednictvím probíhá translokace komplexu do rhoptrií (Richard et al., 2009). RAMA interaguje v Golgiho aparátu se sortilinem, který funguje jako chaperon v sekretorické dráze pro komplex RAMA-RAP1 (Hallée et al., 2018). Proteiny tohoto komplexu mají signální sekvenci vedoucí do rhoptrií. Jakmile dorazí do cílového místa, membrány sekretorických váčků fúzí, čímž vytváří vlastní buněčný kompartment rhoptrií. Obsah sekretorických váčků se tak stává lumen rhoptrií (Howard & Schmidt, 1995).

Sekrece z rhoptry bulb je spuštěna po zformování pohyblivého těsného spoje. Komplex RAP je v průběhu invaze přemisťován do parazitoformní vakuoly vznikajícího trofozoita (Howard et al., 1984).

RAMA (Rhoptry-associated membrane antigen) je protein lokalizovaný na membráně rhoptrií. Původní protein má velikost 170 kDa, je však štěpen proteázou na 60 kDa protein, který je k membráně připevněn GPI (glykosylfosfatidylinositol) kotvou (Topolska et al., 2004). Kromě interakce s RAP-1 tvoří komplex s proteinem sekretovaným z krčku – s RON3 (Ito et al., 2021). Dle autorů recentní studie (Sherling et al., 2019) zprostředkovává RAMA přenos z Golgiho aparátu jen některých proteinů rhoptrií. Zároveň se ve stejné práci prokázalo, že narušení správné exprese tohoto proteinu vede k poruše invaze.

RhopH (rhoptry heavy) komplex sestává ze tří proteinů: RhopH1, RhopH2 a RhopH3 a je identifikovatelný v rhoptriích merozoitů (Bushell et al., 1988). V *P. falciparum* je RhopH1 kódován genem *clag9* z rodiny *clag* (cytoadherence linked asexual gene) (Kaneko et al., 2001). Gen *rhopH1/clag* prošel během evoluce rodu *Plasmodium* několikanásobnou duplikací, což dalo vzniknout pěti známým členům genové rodiny *clag* – *clag 2*, *3.1*, *3.2*, *8* a *9*, přičemž každý RhopH komplex obsahuje pouze jeden z produktů těchto genů (Kaneko et al., 2005). RhopH1 se váže jak k proteinu RhopH2, tak RhopH3, mezi kterými však není přímá interakce (Schureck et al., 2021). Komplex interaguje s plazmatickou membránou červené krvinky prostřednictvím dráhy závislé na sialové kyselině (Sam-Yellowe & Perkins, 1991). Dle recentní studie (Chourasia et al., 2020) je pro protein Clag9 receptorem na hostitelské buňce komplex GPA-band3 (glykophorin A-band 3). Celý komplex je posléze přenesen do parazitoformní vakuoly, kde se podílí na zásobení vakuoly živinami ve formě póru (Schureck et al., 2021). Při výzkumu lokalizace proteinu RhopH2 se ukázalo, že z parazitoformní vakuoly tento protein migruje přes cytoplazmu červené krvinky až na svou konečnou pozici na membráně krvinky, kde interaguje s proteiny hostitelského cytoskeletu (Counihan et al., 2017).

#### **4.1.4. Denzní granule**

Poslední sekreční organelou, která je součástí apikálního komplexu, jsou denzní granule. Jsou to váčky ohraničené membránou, jejichž počet, tvar a velikost se liší mezi druhy i stádii plasmodia. Ačkoli se počítají do invazivního aparátu, jejich funkce je spíše postinvazivní. Při výzkumu *P. knowlesi* bylo objeveno, že po invazi parazita denzní granule

vypouští svůj obsah do parazitoformní vakuoly. Na její membráně byla poté detekována tvorba transportních kanálů (Torii et al., 1989).

Nejdůležitějším z těchto kanálů je tzv. PTEX komplex (Plasmodium Translocon of Exported proteins), jehož struktura byla nedávno popsána pomocí kryoelektronové mikroskopie (Ho et al., 2018). Je složený z několika proteinů sekretovaných z denzních granulí (Koning-Ward et al., 2009) a umožňuje specifickou translokaci proteinů parazita do cytoplazmy červené krvinky. Tento proces je naprosto nezbytný pro povrchovou modifikaci membrány červené krvinky proteiny parazita a následné sekvestraci krvinek z krevního oběhu (Gruenberg et al., 1983). Sekvestrace krvinek znamená navázání infikované krvinky na endotel kapiláry. Tímto způsobem se parazit může ukrýt před imunitním systémem hostitele.

RESA (Ring-infected erythrocyte surface antigen) je protein sekretovaný během invaze denzními granulemi do cytoplazmy červené krvinky (Aikawa et al., 1990; Culvenor et al., 1991). Funkce tohoto proteinu souvisí s deformací krvinek, jež je zásadní pro stádium prstýnku, kdy ještě není krvinka napojena na endotel (Mills et al., 2007). Tato deformace probíhá díky napojení na cytoskeletární protein hostitelské buňky – spektrin (Foley et al., 1994).

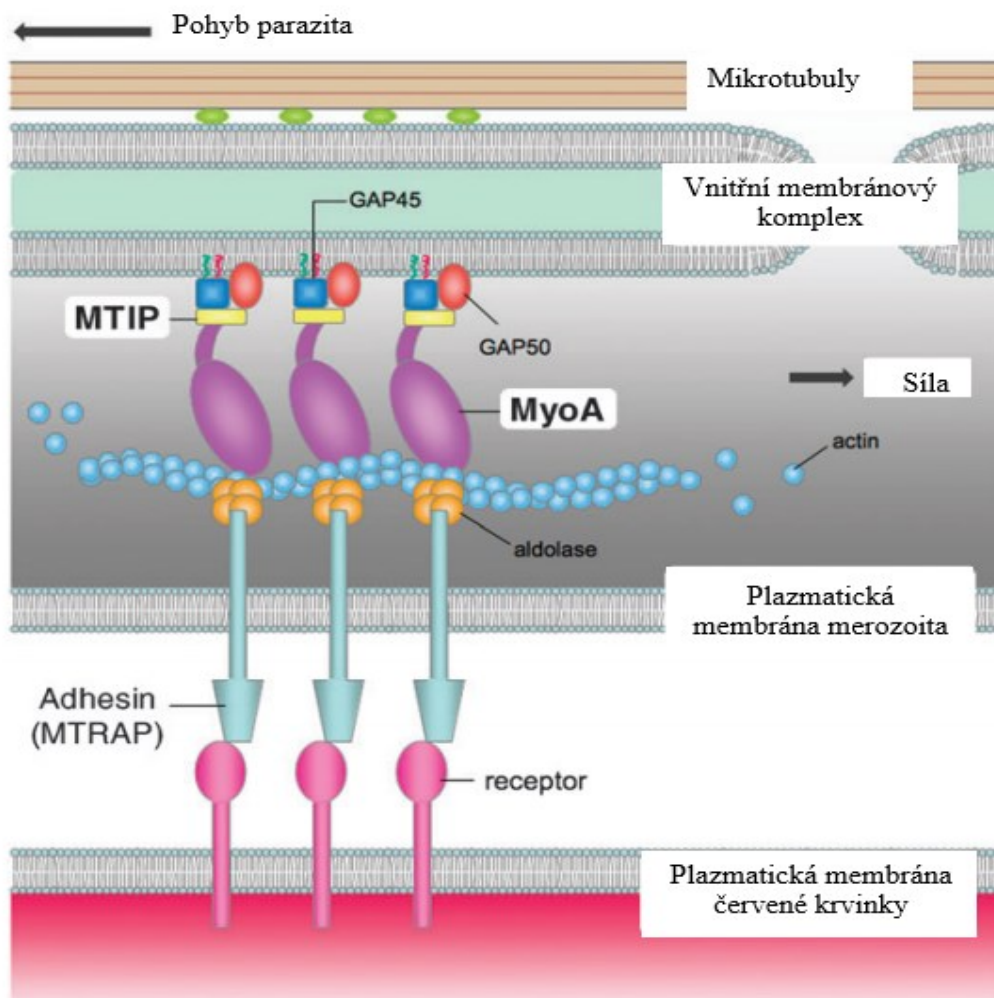
## 4.2. Klouzavý pohyb

Klouzavý pohyb je speciální druh pohybu napomáhající invazi, jehož využívají zástupci kmene Apicomplexa. Pomocí něj je zajišťován pohyb těsného spoje k posteriornímu konci parazita. Důsledkem je potažení merozoita membránou hostitelské buňky a zformování parazitoformní vakuoly. Pohyb zajišťuje komplex glideozomu (Obr. 5) sestávající se z aktinu a myosinu a součástí komplexu IMC (Inner membrane complex) sestaveného z membránových váčků pod plazmatickou membránou.

Komponenty IMC, mezi něž patří GAP45 (gliding-associated protein 45), GAP50 a MTIP (Myosin A tail domain-interacting protein), tvoří komplex s Myosinem A a jsou všechny lokalizované na okrajových částí buňky merozoita (Baum et al., 2006). Jako první je exprimován GAP50 současně se samotnou biogenezí IMC, do kterého je vkládán. Ostatní proteiny jsou translatovány až později ve vývoji parazita (Jones et al., 2006). IMC se vytváří již během schizogonie – jeho funkce tedy nemusí být omezena pouze na invazi, ale může se podílet i na obalení dceřiných merozoitů plazmatickou membránou (Ridzuan et al., 2012).

GAP45 se svým C-koncem váže jak k IMC, tak interaguje s MTIP, který je navázán na myosin A (Bergman et al., 2003), čímž ho připoutává k IMC. GAP50 obsahuje na C-konci transmembránový helix, jehož funkce je ukotvení k IMC, druhou stranou pak interaguje s GAP45 (Bosch et al., 2012). Pro regulaci IMC merozoit využívá CDPK1 (Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase 1), pro kterou je GAP45 a MTIP ligandem (Green et al., 2008; Vaid et al., 2008). Fosforylace GAP45 probíhá však i pomocí jiných kináz, jejichž funkce může mít vliv na sestavování glideozomu (Jones et al., 2009).

Myosin A má v glideozomu funkci motoru. Řadí se do XIV. třídy myosinů. Jeho globulární hlavová doména se váže na polymerizující F-aktin a za hydrolýzy ATP (adenosin trifosfát) je zprostředkován pohyb. Aktin na opačné straně interaguje s aldolázou, která tvoří spojení mezi glideozomem a adheziny (Jewett & Sibley, 2003). Samotná aldoláza podporuje polymerizaci aktinu (Diaz et al., 2014). Zároveň je v kontaktu jak s proteinem MTRAP, tak se na ní váže cytoplazmatická část proteinu AMA-1 (Srinivasan et al., 2011).



Obrázek 5: Schéma molekul zahrnutých v klouzavém pohybu. Převzato z: (Thomas et al., 2010). Upraveno.

### 4.3. Povrchové proteiny merozoita

MSPs (merozoite surface proteins) je další specifická skupina proteinů vyskytujících se na povrchu merozoita, na který je většina z nich přichycena prostřednictvím GPI kotvy (Gilson et al., 2006). Jen malá část těchto proteinů využívá k vazbě na povrch buňky vazbu s jiným MSP proteinem. MSPs nejsou sekretované žádnou z organel invazivního aparátu, podílejí se však také na invazi hostitelské červené krvinky. Jejich role je prvotní kontakt parazita s červenou krvinkou v rámci tzv. neorientovaném přichycení, po kterém nastává reorientace merozoita apikálním koncem k hostitelské buňce.

MSP-1 je majoritním proteinem lokalizovaným přes celý povrch parazita. Tento protein je primárně štěpen již ve fázi schizonta uvnitř hostitelské buňky. Štěpení zajišťuje proteáza SUB-1 a po jeho dokončení je MSP-1 schopen se vázat na molekuly cytoskeletu krvinky -

spektrinu a heparinu a tím je destabilizovat. Interakci se spektrinem potvrzuje taktéž studie (Herrera et al., 1993) . Dle práce (Das et al., 2015) hraje MSP-1 roli v prasknutí plazmatické membrány krvinky, přičemž autoři práce nezpochybňují jeho další aktivitu v invazi. Po tomto primárním proteolytickém štěpení prekurzoru MSP-1 vznikají 4 fragmenty (p83, p33, p30 a p38), které interakcemi mezi sebou tvoří velký komplex (Kauth et al., 2003). MSP-1 se jednou svou doménou váže na receptor band 3 na červené krvince (Goel et al., 2003), zároveň pro vazbu jinou doménou pak využívá hostitelský receptor glykoforin A, který tvoří s band 3 komplex (Baldwin et al., 2015). Sekundární štěpení tohoto proteinu probíhá prostřednictvím proteázy SUB-2, která je sekretována z mikroném (P. K. Harris et al., 2005). Mezi další proteiny z rodiny MSP, u kterých byla prokázána schopnost navázat se na červené krvinky, patří MSP-3 (Rodríguez et al., 2005), MSP-4 (Garcia et al., 2007), MSP-6 (López et al., 2006), MSP-7 (Garcia et al., 2007), MSP-8 (Puentes et al., 2003) a MSP-10 (Puentes et al., 2005).

## 5. Únik z červené krvinky

Merozoit se vytváří diferenciací schizonta, který vzniká v pozdním stádiu infikované červené krvinky. Prvním krokem v životě merozoita je opuštění buňky, ve které se parazit dosud vyvíjel. Existují návrhy tří různých cest, jak toho mohou jedinci *P. falciparum* docílit.

V první z možností dochází k narušení parazitoformní vakuoly a membrány hostitelské buňky. Membrána červené krvinky je podrobena vezikulaci tzn. tvorbou váčků, změně tvaru díky pohybu merozoitů a bobtnání vedoucí k explozivnímu uvolnění těchto merozoitů. Celý tento proces probíhá během jedné minuty (Dvorak et al., 1975).

Druhý model zahrnuje tvorbu kanálu z parazitoformní vakuoly prostřednictvím fúze s membránou červené krvinky, který by umožňoval únik z hostitelské buňky. Ke splynutí by mělo docházet v místech, kde jsou obě membrány v dostatečně blízké vzdálenosti (Clavijo et al., 1998). Tento koncept zároveň předpokládá, že se obsah hostitelské červené krvinky uvolní do extracelulárního okolí.

Podle posledního modelu je celý proces dvoukrokový. Nejdříve dochází k prasknutí membrány parazitoformní vakuoly, čímž se promíchají obsahy vakuoly a hostitelské buňky. Poté následuje narušení membrány červené krvinky (Wickham et al., 2003).

K narušení membrány a degradaci cytoskeletárních proteinů hostitelské buňky jsou pro *P. falciparum* esenciální proteázy. V případě membrány parazitoformní vakuoly zprostředkovává narušení cysteinová proteáza, která je inhibovatelná pomocí E-64 (Rosenthal et al., 1987), pouze však pokud je přidán dříve než v pozdním stádiu schizogonie. Merozoiti jsou po použití E-64 v tenké průhledné membráně, pravděpodobně vakuolárního původu, jelikož je rozpoznávána protilátkami proti komponentům parazitoformní vakuoly (Salmon et al., 2001).

Důležité jsou v tomto procesu kyselé endoproteázy plasmepsin I a II, které jsou nejdříve součástí potravní vakuoly, kde se podílí na štěpení hemoglobinu. Tyto dvě endoproteázy mají odlišnou selektivitou vůči hostitelským proteinům. Pro plasmepsin II to může být kromě hemoglobinu i spektrin, aktin a protein 4.1. U všech těchto proteinů se jedná o součásti cytoskeletu membrány červené krvinky (Le Bonniec et al., 1999). Plasmepsin II se tedy na rozdíl od plasmepsinu I podílí na destabilizaci membrány krvinky a tím i jejího rozpadu. Další proteiny, které hrají roli v rozpadu hostitelské membrány jsou cysteinové proteázy Pf28 a Pf35-40 a serinová proteáza Pf75 (Deguercy et al., 1990).

Zároveň se s výstupem merozoitů z červených krvinek také pojí zvýšení nitrobuněčného tlaku a hypotonické prostředí v hostitelské buňce. Uvolnění parazitů jsou schopni ihned po uvolnění infikovat sousedící červené krvinky (Glushakova et al., 2005). Pravděpodobně se tak děje do jedné minuty.

## 6. Závěr

Invaze červených krvinek je pro *Plasmodium* klíčovým krokem v jeho životě. Invaze sestává z několika kroků, které se konají v následujícím pořadí: neorientované přichycení merozoita na červenou krvinku, reorientace merozoita apikálním komplexem směrem ke krvinece, vytvoření těsného spoje a pohyb těsného spoje podél povrchu merozoita. Těchto kroků se účastní jak povrchové molekuly parazita, tak proteiny sekretované z organel apikálního komplexu – mikroném a rhoptrií. Poslední krok zprostředkovává organela zvaná glideozom, která je sestavena z aktino-myosinového motoru a IMC.

Cílem práce bylo shrnutí informací o invazivním aparátu *P. falciparum* a molekul zahrnutých v invazi. Největší pozornost byla věnována proteinům sekretovaným z mikroném a rhoptrií, a to především těm, které se váží na některý z receptorů červených krvinek nebo se podílí na tvorbě těsného spoje. Na závěr byla přidána kapitola o úniku parazita z červené krvinky, který předchází následující invazi sousedních krvinek dceřinými merozoity.

Text byl také doplněn o kapitulu věnující se životnímu cyklu parazita a onemocnění tropické malárie, pro kterou je *P. falciparum* původcem. Každým rokem malárii podléhá necelý půl milion lidí, z čehož většinu tvoří děti do 5 let (WHO). Další výzkum této problematiky je proto důležitý pro vývoj léčiv a vakcinace, která by zredukovala počet obětí malárie. V tomto odvětví by mohly být užitečné inhibitory invaze červených krvinek. Invaze je totiž komplikovaným procesem sestávajícím se z mnoha specifických kroků, které by mohly být potenciálním cílem pro vývoj léků. Pro většinu procesů invaze již byl objeven jeho inhibitor, jehož optimalizace by mohla vést k vylepšení vlastností a klinickému využití.

## 7. Seznam použité literatury

- Aikawa, M., Miller, L., Johnson, J., & Rabbege, J. (1978). Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *Journal of Cell Biology*, 77(1), 72–82.
- Aikawa, M., Torii, M., Sjölander, A., Berzins, K., Perlmann, P., & Miller, L. H. (1990). Pf155/RESA antigen is localized in dense granules of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Experimental Parasitology*, 71(3), 326–329.
- Alonso, P. L., Sacarlal, J., Aponte, J. J., Leach, A., Macete, E., Milman, J., Mandomando, I., Spiessens, B., Guinovart, C., Espasa, M., Bassat, Q., Aide, P., Ofori-Anyinam, O., Navia, M. M., Corachan, S., Ceuppens, M., Dubois, M.-C., Demoitié, M.-A., Dubovsky, F., Cohen, J. (2004). Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: Randomised controlled trial. *The Lancet*, 364(9443), 1411–1420.
- Bakar, N. A., Klonis, N., Hanssen, E., Chan, C., & Tilley, L. (2010). Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Cell Science*, 123(3), 441–450.
- Baldi, D. L., Good, R., Duraisingh, M. T., Crabb, B. S., & Cowman, A. F. (2002). Identification and disruption of the gene encoding the third member of the low-molecular-mass rho-try complex in *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, 70(9), 5236–5245.
- Baldwin, M. R., Li, X., Hanada, T., Liu, S. C., & Chishti, A. H. (2015). Merozoite surface protein 1 recognition of host glycophorin a mediates malaria parasite invasion of red blood cells. *Blood*, 125(17), 2704–2711.
- Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Dluzewski, A. R., Margos, G., Williams, I. T., Blackman, M. J., Kocken, C. H., Thomas, A. W., & Mitchell, G. H. (2003). *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *Journal of Cell Science*, 116(18), 3825–3834.
- Bartholdson, S. J., Bustamante, L. Y., Crosnier, C., Johnson, S., Lea, S., Rayner, J. C., & Wright, G. J. (2012). Semaphorin-7A is an erythrocyte receptor for *P. falciparum* merozoite-specific TRAP homolog, MTRAP. *PLoS Pathogens*, 8(11)
- \*Bartoloni, A., & Zammarchi, L. (2012). Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1)
- Baum, J., Richard, D., Healer, J., Rug, M., Krnajski, Z., Gilberger, T.-W., Green, J. L., Holder, A. A., & Cowman, A. F. (2006). A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other Apicomplexan parasites. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 5197–5208.
- Bergman, L. W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T. M., Fox, S., Matuschewski, K., Nussenweig, V., & Kappe, S. H. I. (2003). Myosin A tail domain interacting protein (MTIP)

- localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. *Journal of Cell Science*, 116(1), 39–49.
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J. F., & Lebrun, M. (2009). Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. *PLoS Pathogens*, 5(2)
- Bosch, J., Paige, M. H., Vaidya, A. B., Bergman, L. W., & Hol, W. G. J. (2012). Crystal structure of GAP50, the anchor of the invasion machinery in the inner membrane complex of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Structural Biology*, 178(1), 61–73.
- \*Bousema, T., & Drakeley, C. (2011). Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(2), 377–410.
- Bozdech, Z., Llinás, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J., & DeRisi, J. L. (2003). The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biology*, 1(1)
- Bushell, G. R., Ingram, L. T., Fardoulis, C. A., & Cooper, J. A. (1988). An antigenic complex in the rhoptries of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 28(2), 105–112.
- Cao, J., Kaneko, O., Thongkukiattkul, A., Tachibana, M., Otsuki, H., Gao, Q., Tsuboi, T., & Torii, M. (2009). Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Parasitology International*, 58(1), 29–35.
- Carey, K. L., Westwood, N. J., Mitchison, T. J., & Ward, G. E. (2004). A small-molecule approach to studying invasive mechanisms of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(19), 7433–7438.
- Clavijo, C. A., Mora, C. A., & Winograd, E. (1998). Identification of novel membrane structures in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(1), 115–120.
- Counihan, N. A., Chisholm, S. A., Bullen, H. E., Srivastava, A., Sanders, P. R., Jonsdottir, T. K., Weiss, G. E., Ghosh, S., Crabb, B. S., Creek, D. J., Gilson, P. R., & Koning-Ward, T. F. D. (2017). *Plasmodium falciparum* parasites deploy RhopH2 into the host erythrocyte to obtain nutrients, grow and replicate. *ELife*, 6
- \*Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124(4), 755–766.
- \*Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and disease. *Cell*, 167(3), 610–624.
- Crewther, P. E., Culvenor, J. G., Silva, A., Cooper, J. A., & Anders, R. F. (1990). *Plasmodium falciparum*: Two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Experimental Parasitology*, 70(2), 193–206.

- Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D. P., Duraisingh, M. T., Rayner, J. C., & Wright, G. J. (2011). Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*, *480*(7378), 534–537.
- Culvenor, J. G., Day, K. P., & Anders, R. F. (1991). *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infection and Immunity*, *59*(3), 1183–1187.
- Curtidor, H., Patiño, L. C., Arévalo-Pinzón, G., Patarroyo, M. E., & Patarroyo, M. A. (2011). Identification of the *Plasmodium falciparum* rhoptry neck protein 5 (PfRON5). *Gene*, *474*(1), 22–28.
- Das, S., Hertrich, N., Perrin, A. J., Withers-Martinez, C., Collins, C. R., Jones, M. L., Watermeyer, J. M., Fobes, E. T., Martin, S. R., Saibil, H. R., Wright, G. J., Treeck, M., Epp, C., & Blackman, M. J. (2015). Processing of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein MSP1 activates a spectrin-binding function enabling parasite egress from RBCs. *Cell Host and Microbe*, *18*(4), 433–444.
- Deguercy, A., Hommel, M., & Schrével, J. (1990). Purification and characterization of 37-kilodalton proteases from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* which cleave erythrocyte cytoskeletal components. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *38*(2), 233–244.
- Diaz, S. A., Martin, S. R., Grainger, M., Howell, S. A., Green, J. L., & Holder, A. A. (2014). *Plasmodium falciparum* aldolase and the C-terminal cytoplasmic domain of certain apical organellar proteins promote actin polymerization. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *197*(1), 9–14.
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S. J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S. S., Yeung, S., Singhasivanon, P., White, N. J. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England journal of medicine*, *361*(5), 455–467.
- Dorn, A., Vippagunta, S. R., Matile, H., Jaquet, C., Vennerstrom, J. L., & Ridley, R. G. (1998). An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by Quinoline antimalarials. *Biochemical Pharmacology*, *55*(6), 727–736.
- Duraisingh, M. T., Maier, A. G., Triglia, T., & Cowman, A. F. (2003). Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(8), 4796–4801.
- Dvorak, J. A., Miller, L. H., Whitehouse, W. C., & Shiroishi, T. (1975). Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science*, *187*(4178), 748–750.
- Florens, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., Anthony, R. M., Grainger, M., Haynes, J. D., Moch, J. K., Muster, N., Sacci, J. B., Tabb, D. L., Witney, A. A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M. J.,

- Holder, A. A., Sinden, R. E., Yates, J. R., & Carucci, D. J. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, 419(6906), 520–526.
- Foley, M., Corcoran, L., Tilley, L., & Anders, R. (1994). *Plasmodium falciparum*: Mapping the membrane-binding domain in the ring-infected erythrocyte surface antigen. *Experimental Parasitology*, 79(3), 340–350.
- Gallup, J. L., & Sachs, J. D. (2001). The economic burden of malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64(1-2 SUPPL.), 85–96.
- Garcia, Y., Puentes, A., Curtidor, H., Cifuentes, G., Reyes, C., Barreto, J., Moreno, A., & Patarroyo, M. E. (2007). Identifying merozoite surface protein 4 and merozoite surface protein 7 *Plasmodium falciparum* protein family members specifically binding to human erythrocytes suggests a new malarial parasite-redundant survival mechanism. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(23), 5665–5675.
- Gilberger, T.-W., Thompson, J. K., Triglia, T., Good, R. T., Duraisingh, M. T., & Cowman, A. F. (2003). A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14480–14486.
- Gilson, P. R., & Crabb, B. S. (2009). Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *International Journal for Parasitology*, 39(1), 91–96.
- Gilson, P. R., Nebl, T., Vukcevic, D., Moritz, R. L., Sargeant, T., Speed, T. P., Schofield, L., & Crabb, B. S. (2006). Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 5(7), 1286–1299.
- Glushakova, S., Yin, D., Li, T., & Zimmerberg, J. (2005). Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Current Biology*, 15(18), 1645–1650.
- Goel, V. K., Li, X., Chen, H., Liu, S. C., Chishti, A. H., & Oh, S. S. (2003). Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5164–5169.
- Green, J. L., Rees-Channer, R. R., Howell, S. A., Martin, S. R., Knuepfer, E., Taylor, H. M., Grainger, M., & Holder, A. A. (2008). The motor complex of *Plasmodium falciparum*: Phosphorylation by a calcium-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30980–30989.
- Gruenberg, J., Allred, D. R., & Sherman, I. W. (1983). Scanning electron microscope-analysis of the protrusions (knobs) present on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal of Cell Biology*, 97(3), 795–802.

- Hallée, S., Boddey, J. A., Cowman, A. F., & Richard, D. (2018). Evidence that the *Plasmodium falciparum* protein sortilin potentially acts as an escorter for the trafficking of the rhoptry-associated membrane antigen to the rhoptries. *MSphere*, 3(1)
- Harris, K. S., Casey, J. L., Coley, A. M., Masciantonio, R., Sabo, J. K., Keizer, D. W., Lee, E. F., McMahon, A., Norton, R. S., Anders, R. F., & Foley, M. (2005). Binding hot spot for invasion inhibitory molecules on *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infection and Immunity*, 73(10), 6981–6989.
- Harris, P. K., Yeoh, S., Dluzewski, A. R., O'Donnell, R. A., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Bannister, L. H., Mitchell, G. H., & Blackman, M. J. (2005). Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathogens*, 1(3), 241–251.
- Herrera, S., Rudin, W., Herrera, M., Clavijo, P., Mancilla, L., Plata, C. D., Matile, H., & Certa, U. (1993). A conserved region of the MSP-1 surface protein of *Plasmodium falciparum* contains a recognition sequence for erythrocyte spectrin. *EMBO Journal*, 12(4), 1607–1614.
- Ho, C. M., Beck, J. R., Lai, M., Cui, Y., Goldberg, D. E., Egea, P. F., & Zhou, Z. H. (2018). Malaria parasite translocon structure and mechanism of effector export. *Nature*, 561(7721), 70–75.
- Hodder, A. N., Crewther, P. E., Matthewll, M. L. S. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., & Anders, R. F. (1996). The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 29446–29452.
- Hoermann, A., Tapanelli, S., Capriotti, P., Corsano, G. D., Masters, E. K., Habtewold, T., Christophides, G. K., & Windbichler, N. (2021). Converting endogenous genes of the malaria mosquito into simple non-autonomous gene drives for population replacement. *ELife*, 10
- Hossain, M. E., Dhawan, S., & Mohmmmed, A. (2012). The cysteine-rich regions of *Plasmodium falciparum* RON2 bind with host erythrocyte and AMA1 during merozoite invasion. *Parasitology Research*, 110(5), 1711–1721.
- Howard, R. F., & Schmidt, C. M. (1995). The secretory pathway of *Plasmodium falciparum* regulates transport of p82/RAP-1 to the rhoptries. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 74(1), 43–54.
- Howard, R. F., Stanley, H. A., Campbell, G. H., & Reese, R. T. (1984). Proteins responsible for a punctate fluorescence pattern in *Plasmodium falciparum* merozoites. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(6), 1055–1059.
- Hu, K., Roos, D. S., & Murray, J. M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Biology*, 156(6), 1039–1050.
- Chourasia, B. K., Deshmukh, A., Kaur, I., Paul, G., Panda, A., Rathore, S., Singh, S. K., Theisen, M., Mohmmmed, A., & Malhotra, P. (2020). *Plasmodium falciparum* Clag9-associated PfRhopH complex is involved in merozoite binding to human erythrocytes. *Infection and Immunity*, 88(2)

- Ito, D., Han, E.-T., Takeo, S., Thongkukiattkul, A., Otsuki, H., Torii, M., & Tsuboi, T. (2011). Plasmodial ortholog of *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 3 is localized to the rhoptry body. *Parasitology International*, *60*(2), 132–138.
- Ito, D., Hasegawa, T., Miura, K., Yamasaki, T., Arumugam, T. U., Thongkukiattkul, A., Takeo, S., Takashima, E., Sattabongkot, J., Han, E. T., Long, C. A., Torii, M., & Tsuboi, T. (2013). RALP1 is a rhoptry neck erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum* merozoites and a potential blood-stage vaccine candidate antigen. *Infection and Immunity*, *81*(11), 4289–4298.
- Ito, D., Chen, J.-H., Takashima, E., Hasegawa, T., Otsuki, H., Takeo, S., Thongkukiattkul, A., Han, E.-T., & Tsuboi, T. (2021). Identification of a novel RAMA/RON3 rhoptry protein complex in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*.
- Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L. A., Wimmer, E. A., & Jacobs-Lorena, M. (2002). Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, *417*(6887), 452–455.
- \*Jaskiewicz, E., Jodłowska, M., Kaczmarek, R., & Zerka, A. (2019). Erythrocyte glycophorins as receptors for *Plasmodium* merozoites. *Parasites & Vectors*, *12*(1), 317.
- Jewett, T. J., & Sibley, L. D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in Apicomplexan parasites. *Molecular Cell*, *11*(4), 885–894.
- Jones, M. L., Cottingham, C., & Rayner, J. C. (2009). Effects of calcium signaling on *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion and post-translational modification of gliding-associated protein 45 (PfGAP45). *Molecular and Biochemical Parasitology*, *168*(1), 55–62.
- Jones, M. L., Kitson, E. L., & Rayner, J. C. (2006). *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: A conserved myosin associated complex. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *147*(1).
- Kaneko, O., Lim, B. Y. S. Y., Iriko, H., Ling, I. T., Otsuki, H., Grainger, M., Tsuboi, T., Adams, J. H., Mattei, D., Holder, A. A., & Torii, M. (2005). Apical expression of three RhopH1/Clag proteins as components of the *Plasmodium falciparum* RhopH complex. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *143*(1).
- Kaneko, O., Tsuboi, T., Ling, I. T., Howell, S., Shirano, M., Tachibana, M., Cao, Y. M., Holder, A. A., & Torii, M. (2001). The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the clag multigene family in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *118*(2), 223–231.
- Kauth, C. W., Epp, C., Bujard, H., & Lutz, R. (2003). The merozoite surface protein 1 complex of human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: Interactions and arrangements of subunits. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(25), 22257–22264.
- Knuepfer, E., Suleyman, O., Dluzewski, A. R., Straschil, U., O’Keeffe, A. H., Ogun, S. A., Green, J. L., Grainger, M., Tewari, R., & Holder, A. A. (2014). RON12, a novel *Plasmodium*-specific

- rhoptry neck protein important for parasite proliferation. *Cellular Microbiology*, 16(5), 657–672.
- Koning-Ward, T. F. D., Gilson, P. R., Boddey, J. A., Rug, M., Smith, B. J., Papenfuss, A. T., Sanders, P. R., Lundie, R. J., Maier, A. G., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2009). A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature*, 459(7249), 945–949.
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Normand, B. V.-L., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J. F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., & Lebrun, M. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathogens*, 7(2)
- Lanzillotti, R., & Coetzer, T. L. (2006). The 10 kDa domain of human erythrocyte protein 4.1 binds the *Plasmodium falciparum* EBA-181 protein. *Malaria Journal*, 5(1), 100.
- Le Bonniec, S., Deregnacourt, C., Redeker, V., Banerjee, R., Grellier, P., Goldberg, D. E., & Schrével, J. (1999). Plasmepsin II, an acidic hemoglobinase from the *Plasmodium falciparum* food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 14218–14223.
- Lebrun, M., Michelin, A., Hajj, H. E., Poncet, J., Bradley, P. J., Vial, H., & Dubremetz, J. F. (2005). The rhoptry neck protein RON4 relocates at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cellular Microbiology*, 7(12), 1823–1833.
- Li, X., Marinkovic, M., Russo, C., McKnight, C. J., Coetzer, T. L., & Chishti, A. H. (2012). Identification of a specific region of *Plasmodium falciparum* EBL-1 that binds to host receptor glycophorin B and inhibits merozoite invasion in human red blood cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 183(1), 23–31.
- Lopaticki, S., Maier, A. G., Thompson, J., Wilson, D. W., Tham, W. H., Triglia, T., Gout, A., Speed, T. P., Beeson, J. G., Healer, J., & Cowman, A. F. (2011). Reticulocyte and erythrocyte binding-like proteins function cooperatively in invasion of human erythrocytes by malaria parasites. *Infection and Immunity*, 79(3), 1107–1117.
- López, R., Valbuena, J., Rodríguez, L. E., Ocampo, M., Vera, R., Curtidor, H., Puentes, A., García, J., Ramirez, L. E., & Patarroyo, M. E. (2006). *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 6 (MSP-6) derived peptides bind erythrocytes and partially inhibit parasite invasion. *Peptides*, 27(7), 1685–1692.
- Marsh, K., Forster, D., Waruiru, C., Mwangi, I., Winstanley, M., Marsh, V., Newton, C., Winstanley, P., Warn, P., Peshu, N., Pasvol, G., & Snow, R. (1995). Indicators of life-threatening malaria in African children. *New England Journal of Medicine*, 332(21), 1399–1404.
- Mayer, D. C. G., Cofie, J., Jiang, L., Hartl, D. L., Tracy, E., Kabat, J., Mendoza, L. H., & Miller, L. H. (2009). Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(13), 5348–5352.

- \*Meibalan, E., & Marti, M. (2017). Biology of malaria transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(3)
- Meshnick, S. R., Yang, Y. Z., Lima, V., Kuypers, F., Kamchonwongpaisan, S., & Yuthavong, Y. (1993). Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(5), 1108–1114.
- \*Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415(6872), 673–679.
- Mills, J. P., Diez-Silva, M., Quinn, D. J., Dao, M., Lang, M. J., Tan, K. S. W., Lim, C. T., Milon, G., David, P. H., Mercereau-Puijalon, O., Bonnefoy, S., & Suresh, S. (2007). Effect of plasmodial RESA protein on deformability of human red blood cells harboring *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9213–9217.
- \*Milner, D. A. (2018). Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(1)
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C. R., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., & Rodríguez, A. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 291(5501), 141–144.
- Narum, D. L., & Thomas, A. W. (1994). Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 67(1), 59–68.
- Olivieri, A., Collins, C. R., Hackett, F., Withers-Martinez, C., Marshall, J., Flynn, H. R., Skehel, J. M., & Blackman, M. J. (2011). Juxtamembrane shedding of *Plasmodium falciparum* AMA1 is sequence independent and essential, and helps evade invasion-inhibitory antibodies. *PLoS Pathogens*, 7(12)
- \*Peters, W. (1998). Drug resistance in malaria parasites of animals and man. In J. R. Baker, R. Muller, & D. Rollinson (Ed.), *Advances in Parasitology*, 41, 1–62.
- Peterson, D. S., Miller, L. H., & Wellems, T. E. (1995). Isolation of multiple sequences from the *Plasmodium falciparum* genome that encode conserved domains homologous to those in erythrocyte-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(15), 7100–7104.
- Peterson, M. G., Marshall, V. M., Smythe, J. A., Crewther, P. E., Lew, A., Silva, A., Anders, R. F., & Kemp, D. J. (1989). Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular Biology*, 9(7), 3151–3154.
- Proellocks, N. I., Kats, L. M., Sheffield, D. A., Hanssen, E., Black, C. G., Waller, K. L., & Coppel, R. L. (2009). Characterisation of PfRON6, a *Plasmodium falciparum* rhoptry neck protein with a novel cysteine-rich domain. *International Journal for Parasitology*, 39(6), 683–692.
- Puentes, A., García, J., Ocampo, M., Rodríguez, L., Vera, R., Curtidor, H., López, R., Suarez, J., Valbuena, J., Vanegas, M., Guzman, F., Tovar, D., & Patarroyo, M. E. (2003). *P. falciparum*:

- Merozoite surface protein-8 peptides bind specifically to human erythrocytes. *Peptides*, 24(7), 1015–1023.
- Puentes, A., Ocampo, M., Rodríguez, L. E., Vera, R., Valbuena, J., Curtidor, H., García, J., López, R., Tovar, D., Cortes, J., Rivera, Z., & Patarroyo, M. E. (2005). Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-10 human erythrocyte specific binding regions. *Biochimie*, 87(5), 461–472.
- \*Ridley, R. G. (2002). Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, 415(6872), 686–693.
- Ridzuan, M. A. M., Moon, R. W., Knuepfer, E., Black, S., Holder, A. A., & Green, J. L. (2012). Subcellular location, phosphorylation and assembly into the motor complex of GAP45 during *Plasmodium falciparum* schizont development. *PLoS ONE*, 7(3)
- Riglar, D. T., Richard, D., Wilson, D. W., Boyle, M. J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., Angrisano, F., Marapana, D. S., Rogers, K. L., Whitchurch, C. B., Beeson, J. G., Cowman, A. F., Ralph, S. A., & Baum, J. (2011). Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host & Microbe*, 9(1), 9–20.
- Richard, D., Kats, L. M., Langer, C., Black, C. G., Mitri, K., Boddey, J. A., Cowman, A. F., & Coppel, R. L. (2009). Identification of rhoptry trafficking determinants and evidence for a novel sorting mechanism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathogens*, 5(3)
- Rodríguez, L. E., Curtidor, H., Ocampo, M., Garcia, J., Puentes, A., Valbuena, J., Vera, R., López, R., & Patarroyo, M. E. (2005). Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 3 (MSP3) protein peptides that bind specifically to erythrocytes and inhibit merozoite invasion. *Protein Science*, 14(7), 1778–1786.
- Rosenthal, P. J., Kim, K., McKerrow, J. H., & Leech, J. H. (1987). Identification of three stage-specific proteinases of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Experimental Medicine*, 166(3), 816–821.
- Salmon, B. L., Oksman, A., & Goldberg, D. E. (2001). Malaria parasite exit from the host erythrocyte: A two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), 271–276.
- Sam-Yellowe, T. Y., & Perkins, M. E. (1991). Interaction of the 140/130/110 kDa rhoptry protein complex of *Plasmodium falciparum* with the erythrocyte membrane and liposomes. *Experimental Parasitology*, 73(2), 161–171.
- Sherling, E. S., Perrin, A. J., Knuepfer, E., Russell, M. R. G., Collinson, L. M., Miller, L. H., & Blackman, M. J. (2019). The *Plasmodium falciparum* rhoptry bulb protein RAMA plays an essential role in rhoptry neck morphogenesis and host red blood cell invasion. *PLoS Pathogens*, 15(9)

- Schureck, M. A., Darling, J. E., Merk, A., Shao, J., Daggupati, G., Srinivasan, P., Olinares, P. D. B., Rout, M. P., Chait, B. T., Wollenberg, K., Subramaniam, S., & Desai, S. A. (2021). Malaria parasites use a soluble Rhop complex for erythrocyte invasion and an integral form for nutrient uptake. *ELife*, *10*, 1–24.
- \*Sibley, L. D., Håkansson, S., & Carruthers, V. B. (1998). Gliding motility: An efficient mechanism for cell penetration. *Current Biology*, *8*(1), R12–R14.
- Siciliano, G., Costa, G., Suárez-Cortés, P., Valleriani, A., Alano, P., & Levashina, E. A. (2020). Critical steps of *Plasmodium falciparum* ookinete maturation. *Frontiers in Microbiology*, *11*.
- Sim, B. K., Chitnis, C. E., Wasniowska, K., Hadley, T. J., & Miller, L. H. (1994). Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science*, *264*(5167), 1941–1944.
- \*Sinden, R. E. (1983). The cell biology of sexual development in *Plasmodium*. *Parasitology*, *86*(4), 7–28.
- Singh, S., Alam, M. M., Pal-Bhowmick, I., Brzostowski, J. A., & Chitnis, C. E. (2010). Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS Pathogens*, *6*(2)
- Slater, A. F. G. (1993). Chloroquine: Mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacology & Therapeutics*, *57*(2), 203–235.
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y., & Hay, S. I. (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, *434*(7030), 214–217.
- Soulard, V., Bosson-Vanga, H., Lorthiois, A., Roucher, C., Franetich, J.-F., Zanghi, G., Bordessoulles, M., Tefit, M., Thellier, M., Morosan, S., Le Naour, G., Capron, F., Suemizu, H., Snounou, G., Moreno-Sabater, A., & Mazier, D. (2015). *Plasmodium falciparum* full life cycle and *Plasmodium ovale* liver stages in humanized mice. *Nature Communications*, *6*(1), 7690.
- Srinivasan, P., Beatty, W. L., Diouf, A., Herrera, R., Ambroggio, X., Moch, J. K., Tyler, J. S., Narum, D. L., Pierce, S. K., Boothroyd, J. C., Haynes, J. D., & Miller, L. H. (2011). Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(32), 13275–13280.
- \*Sturm, A., & Heussler, V. (2007). Live and let die: Manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic *Plasmodium* parasites. *Medical Microbiology and Immunology*, *196*(3), 127–133.
- Tavares, J., Formaglio, P., Thiberge, S., Mordelet, E., Van Rooijen, N., Medvinsky, A., Ménard, R., & Amino, R. (2013). Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *Journal of Experimental Medicine*, *210*(5), 905–915.
- Taylor, H. M., Triglia, T., Thompson, J., Sajid, M., Fowler, R., Wickham, M. E., Cowman, A. F., & Holder, A. A. (2001). *Plasmodium falciparum* homologue of the genes for *Plasmodium vivax*

- and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins, which is transcribed but not translated. *Infection and Immunity*, 69(6), 3635–3645.
- Terkuile, F., White, N. J., Holloway, P., Pasvol, G., & Krishna, S. (1993). *Plasmodium falciparum*: In vitro studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. *Experimental Parasitology*, 76(1), 85–95.
- Tewari, R., Spaccapelo, R., Bistoni, F., Holder, A. A., & Crisanti, A. (2002). Function of region I and II adhesive motifs of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in sporozoite motility and infectivity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49)
- Tham, W. H., Wilson, D. W., Lopaticki, S., Schmidt, C. Q., Tetteh-Quarcoop, P. B., Barlow, P. N., Richard, D., Corbin, J. E., Beeson, J. G., & Cowman, A. F. (2010). Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for *Plasmodium falciparum* PfRh4 invasion ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17327–17332.
- Thomas, J. C., Green, J. L., Howson, R. I., Simpson, P., Moss, D. K., Martin, S. R., Holder, A. A., Cota, E., & Tate, E. W. (2010). Interaction and dynamics of the *Plasmodium falciparum* MTIP-MyoA complex, a key component of the invasion motor in the malaria parasite. *Molecular BioSystems*, 6(3), 494–498.
- Tolia, N. H., Enemark, E. J., Sim, B. K. L., & Joshua-Tor, L. (2005). Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell*, 122(2), 183–193.
- Topolska, A. E., Lidgett, A., Truman, D., Fujioka, H., & Coppel, R. L. (2004). Characterization of a membrane-associated rhoptry protein of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4648–4656.
- Torii, M., Adams, J. H., Miller, L. H., & Aikawa, M. (1989). Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. *Infection and Immunity*, 57(10), 3230–3233.
- Triglia, T., Duraisingh, M. T., Good, R. T., & Cowman, A. F. (2005). Reticulocyte-binding protein homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 55(1), 162–174.
- \*Tuteja, R. (2007). Malaria – an overview. *The FEBS Journal*, 274(18), 4670–4679.
- Uchime, O., Herrera, R., Reiter, K., Kotova, S., Shimp, R. L., Miura, K., Jones, D., Lebowitz, J., Ambroggio, X., Hurt, D. E., Jin, A. J., Long, C., Miller, L. H., & Narum, D. L. (2012). Analysis of the conformation and function of the *Plasmodium falciparum* merozoite proteins MTRAP and PTRAMP. *Eukaryotic Cell*, 11(5), 615–625.
- Vaid, A., Thomas, D. C., & Sharma, P. (2008). Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(9), 5589–5597.

- Waters, A. P., Thomas, A. W., Deans, J. A., Mitchell, G. H., Hudson, D. E., Miller, L. H., McCutchan, T. F., & Cohen, S. (1990). A merozoite receptor protein from *Plasmodium knowlesi* is highly conserved and distributed throughout *Plasmodium*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(29), 17974–17979.
- Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalertpaisarn, T., Tham, W. H., Jong, N. W. M. de, Harvey, K. L., Fowkes, F. J. I., Barlow, P. N., Rayner, J. C., Wright, G. J., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2015). Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *PLoS Pathogens*, 11(2)
- White, N. J., Warrell, D. A., Chanthavanich, P., Looareesuwan, S., Warrell, M. J., Krishna, S., Williamson, D. H., & Turner, R. C. (1983). Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in *falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*, 309(2), 61–66.
- WHO (<https://www.who.int/health-topics/malaria>)
- Wickham, M. E., Culvenor, J. G., & Cowman, A. F. (2003). Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte\*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37658–37663.
- \*Xie, S. C., Ralph, S. A., & Tilley, L. (2020). K13, the cytosome, and artemisinin resistance. *Trends in Parasitology*, 36(6), 533–544.