

Infeksi *Plasmodium berghei* dan Kesannya ke atas Pengisyaratan MAP Kinase Eritrosit Perumah

(*Plasmodium berghei* Infection and its Effect on MAP Kinase Signaling in its Erythrocyte Host)

MOHD FAKHARUL ZAMAN RAJA YAHYA & HASIDAH MOHD SIDEK*

ABSTRAK

Kajian ini melibatkan pemantauan perkembangan parasitemia dan taburan morfologi *Plasmodium berghei* sewaktu infeksi parasit dalam mencit, serta penentuan kesan infeksi *P. berghei* ke atas pengisyaratan MAP kinase eritrosit perumah. Analisis mikroskop ke atas slaid calitan darah terwarna-Giemsa yang disediakan daripada mencit terinfeksi-*P. berghei* (strain PZZ1/00) menunjukkan darjah parasitemia mencapai sehingga 70% dalam masa dua minggu selepas penyuntikan parasit. Morfologi cecincin dan trofozoit parasit dicerap dengan jelas sepanjang tempoh infeksi manakala morfologi skizon parasit hanya dicerap dengan ketara selepas hari ketiga selepas penyuntikan parasit. Pemblotan Western [antibodi primer: anti-MAP kinase (ERK-1/2 tak terfosfat) monoklon; antibodi sekunder: anti-IgG, poliklon terkonjugat-HRP] ke atas protein sitosol eritrosit terinfeksi-*P. berghei* (70% parasitemia) susulan pemisahan SDS-PAGE menunjukkan bahawa keamatan protein imunoreaktif-MAP kinase eritrosit berberat molekul 42 dan 44 kDa didapati meningkat secara signifikan ($p < 0.05$) pada 70% iaitu peningkatan sebanyak 21.5% dan 22.3% masing-masing berbanding sampel kawalan tanpa infeksi. Samada kesan infeksi *P. berghei* (70% parasitemia) ke atas pengisyaratan MAP kinase perumah ini berkaitan dengan pengaktifan enzim ini perlu dikaji dengan lebih lanjut.

Kata kunci: MAP kinase; malaria; *Plasmodium berghei*; transduksi isyarat

ABSTRACT

The present investigation involves monitoring the development of parasitemia and the distribution of *Plasmodium berghei* morphologies during parasite infection in mice as well as the effect *P. berghei* infection on MAP kinase signaling in its erythrocyte host. Microscopic analyses of Giemsa-stained blood films prepared from *P. berghei* (strain PZZ1/00)-infected mice showed that the level of parasitemia reached up to 70% two weeks after inoculation of the parasite. Parasite ring and trophozoite forms were clearly detected in the blood films throughout the study period while the schizont form was visibly observed on day 3 post-inoculation. Western blotting [primary antibody: monoclonal anti-MAP kinase (non-phosphorylated ERK-1/2); secondary antibody: HRP-conjugated polyclonal anti-IgG] carried out on SDS-PAGE-separated cytosolic protein samples from *P. berghei*-infected (70% parasitemia) erythrocytes showed that the levels of both 42 and 44 kDa MAP kinase-immunoreactive proteins increased significantly ($p < 0.05$) at 70% parasitemia, by up to 21.5% and 22.3% respectively as compared to non-infected control samples. Whether the effect of *P. berghei* infection at 70% parasitemia on host MAP kinase signaling is related to the MAP kinase activation remains to be further investigated.

Keyword: Malaria; MAP kinase; *Plasmodium berghei*; signal transduction

PENGENALAN

Plasmodium berghei, salah satu parasit malaria yang menginfeksi haiwan rodensia (Thomas 1983), mempunyai kitar hidup yang kompleks. Kitar seksual *P. berghei* yang mengambil masa lebih kurang 24 jam (Jones & Edmundson 1989) dalam perumah vertebrata bermula apabila sporozoit dari nyamuk terinfeksi memasukiedaran darah dan menyerang sel parenkima hepar. Dalam hepatosit, skizon eksoeritrosit hasil pembiakan sporozoit secara skizogoni, menjalani proses pematangan dan penunasan untuk membentuk merozoit. Pemecahan hepatosit membebaskan beribu-ribu merozoit ke dalam aliran darah dan penukaran merozoit kepada trofozoit

dan seterusnya skizon berlaku dalam sel eritrosit (Phillips 1983).

Penglibatan protein kinase dilaporkan penting dalam kitar hidup parasit dalam perumah (Doerig 2004). Protein kinase teraktif-mitogen (MAP kinase) merupakan satu famili protein kinase yang fungsi dan pengawalaturannya terpulihara dari organisma unisel seperti yis sehinggalah organisma kompleks seperti manusia. Pengisyaratan MAP kinase memainkan peranan penting dalam proses pengekspresan gen, metabolisme (Johnson & Lapadat 2002), embriogenesis, pembezaan sel, proliferasi sel dan apoptosis (Berman et al. 2001). Kasked MAP kinase menjadi fokus dalam kajian terkini untuk penghasilan

dadah bagi pelbagai penyakit seperti kanser (Roberts & Der 2007), diabetes (Evans et al. 2002), infarksi miokardial (Liao et al. 2001), infeksi *Human Rhino Virus* (HRV) (Hall et al. 2005) dan juga infeksi *Plasmodium* (Laurent 2006). Walau bagaimanapun, penglibatan pengisyratan MAP kinase eritrosit perumah dalam infeksi *Plasmodium* masih belum diketahui. Maka, analisis ke atas profil protein imunoreaktif-MAP kinase eritrosit perumah dilakukan bagi menentukan kesan infeksi *Plasmodium* ke atas pengisyratan MAP kinase eritrosit perumah.

Dalam kajian ini, pemantauan ke atas corak perkembangan parasitemia, kadar proliferasi parasit dan juga taburan morfologi parasit sewaktu infeksi parasit dalam mencit dilakukan melalui analisis mikroskop ke atas slaid calitan darah terwarna-Giemsa yang disediakan daripada mencit kajian terinfeksi-*P. berghei* (strain PZZ1/00). Hasil pembloatan Western [antibodi primer: anti-MAP kinase (ERK1/2 tak terfosfat) monoklon (Sigma, USA); antibodi sekunder: anti-IgG, poliklon terkonjugat-HRP (Promega, USA)] ke atas protein sitosol eritrosit terinfeksi-*P. berghei* (70% parasitemia) susulan pemisahan SDS-PAGE, dibandingkan dengan sampel protein kawalan tanpa infeksi.

BAHAN DAN KAEDAH

SAMPEL DAN REKA BENTUK KAJIAN

Mencit putih jantan (strain HSD) berusia 6 minggu bercerai susu dan parasit malaria *Plasmodium berghei* strain PZZ1/00 dibekalkan oleh Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor. Sebanyak 20 ekor mencit tersebut telah diagihkan kepada dua set iaitu sebanyak 10 ekor untuk set mencit terinfeksi-*P. berghei* dan juga 10 ekor untuk set mencit kawalan tanpa infeksi. Sembilan ekor mencit ($n=3 \times 3$) digunakan untuk persampelan dan seekor sebagai simpanan.

PENYEDIAAN INOKULAT *P. BERGHEI* DAN PENYUNTIKAN PARASIT

Darah (30-40 μ l) daripada hujung ekor mencit stok terinfeksi-*P. berghei* (pada aras parasitemia 20%) dicairkan dengan larutan Alservier. Takaran parasit yang digunakan dalam kajian ini ialah ialah 1×10^6 eritrosit terinfeksi per 100 μ l. Mencit kajian disuntik dengan 100 μ l darah terinfeksi-*P. berghei* (yang telah dicairkan dengan larutan Alservier) secara intraperitoneum (David et al. 2004).

PENYEDIAAN SLAID TERWARNA-GIEMSA

Setitis darah mencit kajian terinfeksi-*P. berghei* daripada potongan pada hujung ekor mencit dicalitkan pada slaid kaca dan ditetapkan dengan metanol (satu minit) yang kemudiannya diwarnakan dengan larutan Giemsa (5 kali pencairan dengan penimbal fosfat pada pH 6.8). Kemudian slaid tersebut dicerap di bawah mikroskop cahaya dengan kuasa pembesaran 100 kali menggunakan minyak imersi

bagi tujuan penentuan darjah parasitemia (Field & Shute 1955) dan pengecaman morfologi parasit.

PENYEDIAAN FRAKSI PROTEIN SITOSOL ERITROSIT

Fraksi supernatan (sitosol eritrosit) diperoleh melalui pengemparan sel eritrosit terinfeksi (*P. berghei* dan kawalan tanpa infeksi) pada 2300 g selama 10 minit (Bavil et al. 2004), disusuli dengan pemendakan hemoglobin daripada fraksi tersebut menggunakan campuran etanol:butanol (60:40) (Frantzen et al. 1997). Kemudian protein terlarut ditambah dengan aseton sejuk dengan nisbah 1:1 untuk pemendakan protein (Jiang et al. 2004).

ANALISIS PROTEIN

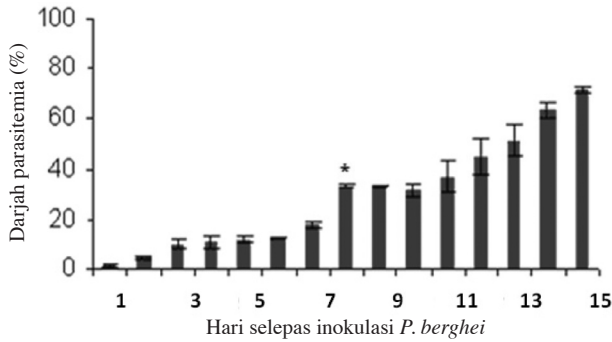
Penentuan jumlah protein bagi setiap sampel dilakukan mengikut kaedah Bradford (1976) sebelum pemisahan protein menggunakan SDS-PAGE (Laemmli 1970). Pembloatan Western (Towbin et al. 1979) ke atas protein sitosol terpisah-SDS PAGE melibatkan anti-MAP kinase (ERK1/2 tak terfosfat) monoklon (antibodi primer) (Sigma, USA) dan anti-IgG, poliklon terkonjugat-HRP (antibodi sekunder) (Promega, USA). Hasil pembloatan Western seterusnya dianalisis secara densitometri yang memberikan nilai keamatan relatif jalur protein imunoreaktif-MAP kinase.

ANALISIS STATISTIK

Ujian T berpasangan digunakan bagi menentukan kesignifikan perbezaan antara nilai keamatan relatif jalur protein sitosol imunoreaktif-MAP kinase mencit terinfeksi - *P. berghei* dan kawalan tanpa infeksi.

HASIL DAN PERBINCANGAN

Aruhan malaria ke atas mencit dipantau selama 15 hari di mana hari ke-15 selepas penyuntikan parasit merupakan tempoh paling lama bagi mencit terinfeksi-*P. berghei* dapat bermandiri pada takaran parasit $\sim 1 \times 10^6$ eritrosit terinfeksi-*P. berghei* per 100 μ l setelah beberapa percubaan dilakukan. Darjah parasitemia mencapai $1.52 \pm 0.42\%$ dan $71.96 \pm 1.39\%$ pada hari pertama dan ke-15 selepas penyuntikan parasit masing-masing (Rajah 1). Peningkatan parasitemia adalah ketara dari hari pertama hingga ketiga ($1.52 \pm 0.42\%$ kepada $10.04 \pm 1.59\%$), keenam hingga kelapan ($11.97 \pm 0.49\%$ kepada $33.56 \pm 0.99\%$) dan kesepuluh hingga ke-15 ($31.38 \pm 2.62\%$ kepada $71.96 \pm 1.39\%$) selepas penyuntikan parasit. Bagaimanapun pada hari keenam, kesembilan dan kesepuluh selepas penyuntikan parasit, darjah parasitemia merosot sebanyak 0.08%, 0.54% dan 1.64% masing-masing. Darjah parasitemia yang rendah iaitu (<10%) pada peringkat awal penginfeksian adalah disebabkan tempoh pengeraman selepas penyuntikan parasit ke dalam mencit (Thurston 1953). Parasit dalam tempoh

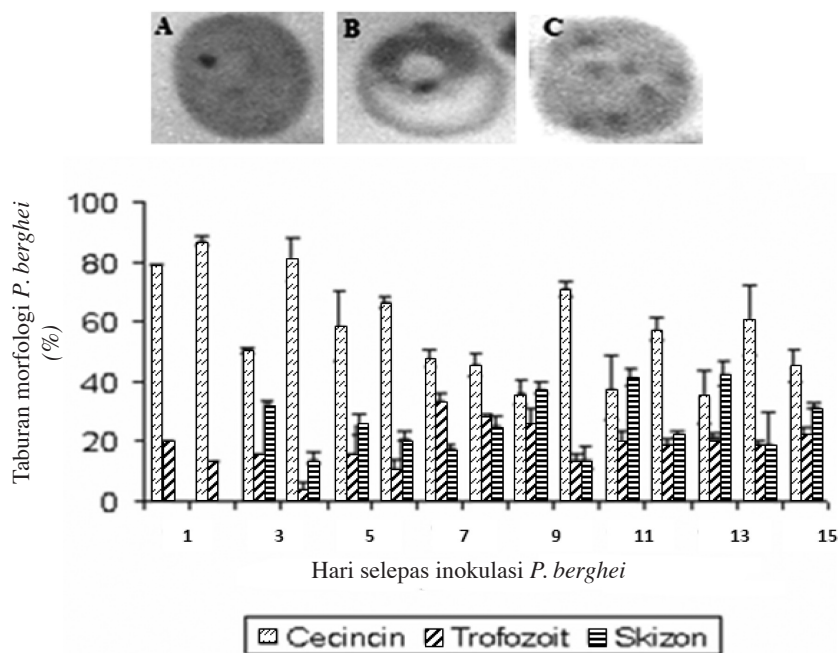


RAJAH 1. Perkembangan parasitemia dalam eritrosit mencit terinfeksi-*P. berghei*. Cerapan darjah parasitemia dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan kuasa pembesaran 100 ×. Data merupakan purata nilai tiga bacaan (n=3) ± S.E.M. Perubahan nilai yang signifikan (p<0.005) diwakili oleh (*)

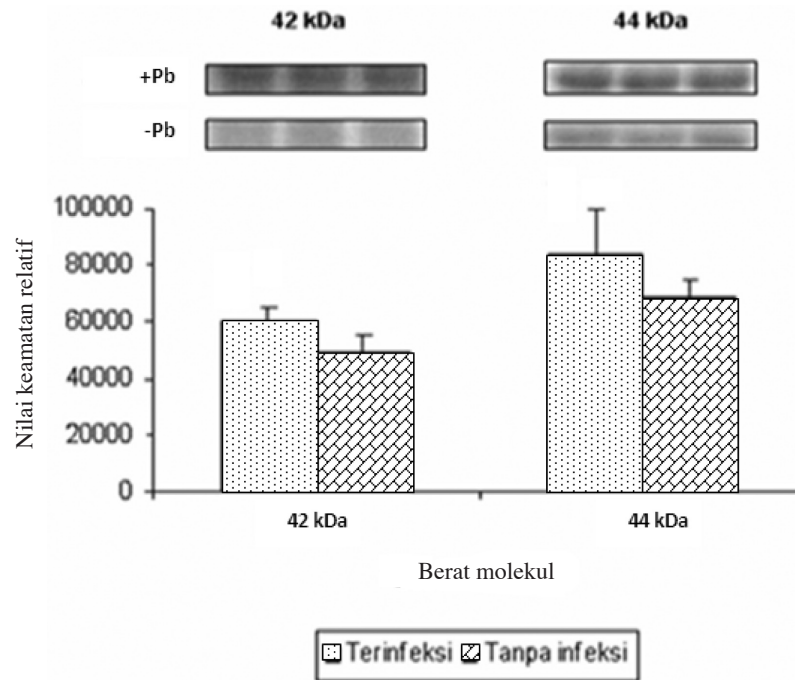
tersebut perlu bermandiri terhadap keadaan ekstrasel untuk seketika sementara mengenal dan melekat kepada eritrosit. Setelah parasit tersebut berjaya memasuki eritrosit, penginfeksi berlaku secara mendadak dan ini membawa kepada penginfeksi eritrosit normal dengan lebih banyak (Phillips 1983). Bagaimanapun, kajian ini menunjukkan bahawa perkembangan darjah parasitemia pada peringkat awal infeksi adalah agak pesat. Sementara itu, kemerosotan darjah parasitemia semasa infeksi mungkin berkait dengan hemolisis sel eritrosit terinfeksi-*P. berghei* yang membebaskan beribu-ribu merozoit ke dalam aliran darah. Ini dapat dilihat pada hari keenam, kesembilan dan kesepuluh selepas infeksi dilakukan ke atas mencit kajian.

Slaid calitan darah terinfeksi-*P. berghei* yang diwarnakan dengan Giemsa telah menunjukkan bahawa morfologi cecincin dan trofozoit parasit hadir dalam eritrosit mencit terinfeksi sepanjang tempoh kajian manakala skizon hanya jelas dicerap pada hari ketiga selepas penyuntikan parasit (Rajah 2). Ketidak jelasan cerapan morfologi skizon ini bagaimanapun tidak bermaksud ketidak hadirannya langsung morfologi skizon pada peringkat ini. Selain itu, cecincin merupakan morfologi parasit yang dominan sepanjang tempoh infeksi di mana peratusannya tidak pernah kurang daripada 35%. Manakala peratusan trofozoit dan skizon yang tertinggi dicapai ialah 34.09 ± 1.0% (hari ketujuh selepas penyuntikan parasit) dan 42.73 ± 10.15% (hari ke-13 selepas penyuntikan parasit) masing-masing. Selain itu, didapati juga bahawa peningkatan peratusan skizon berkorelasi dengan kemerosotan peratusan cecincin sepanjang infeksi. Persampelan dilakukan pada 70% parasitemia (hari ke-15 selepas infeksi) yang mana corak taburan morfologi *P. berghei* ialah 45.34 ± 5.03% (cecincin), 22.67 ± 5.03% (trofozoit) dan 31.98 ± 6.03% (skizon). Dalam keseluruhan tempoh infeksi yang dikaji, peratusan morfologi skizon parasit adalah paling rendah berbanding morfologi lain. Ini mungkin kerana morfologi tersebut hilang daripada sistem aliran darah dan melekat pada sel endotelium di mana struktur knob berperanan sebagai titik perlekatan dalam fenomena tersebut (Macpherson et al. 1985).

Infeksi *P. berghei* (70% parasitemia) didapati mempengaruhi aras protein sitosol imunoreaktif-MAP kinase (jalur protein 42 kDa dan 44 kDa) eritrosit mencit (Rajah 3). Analisis densitometri ke atas jalur protein imunoreaktif-MAP kinase 44 kDa menunjukkan bahawa nilai keamatan



RAJAH 2. Taburan morfologi *P. berghei* semasa infeksi. (A/▨) mewakili bentuk cecincin; (B/▩) mewakili bentuk trofozoit dan (C/▬) mewakili bentuk skizon. Cerapan morfologi dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan kuasa pembesaran 100 ×. Data merupakan purata nilai tiga bacaan (n=3) ± S.E.M.



RAJAH 3. Nilai keamatan relatif jalur protein imunoreaktif-MAP kinase berberat molekul 42 kDa dan 44 kDa eritrosit mencit terinfeksi-*P. berghei* (▨) dan kawalan tanpa infeksi (▩). Protein sitosol eritrosit mencit (terinfeksi-*P. berghei* dan kawalan tanpa infeksi)-terpisah SDS PAGE dipindahkan ke atas membran nitroselulosa dan diprobkan dengan antibodi [antibodi primer: anti-MAP kinase (ERK1/2 tak terfosfat) monoklon; antibodi sekunder : anti-IgG, HRP konjugat poliklon].

Jalur protein imunoreaktif-MAP kinase yang telah dikesan secara *chemiluminescence* seterusnya dianalisis secara densitometri. Data yang ditunjukkan adalah diwakili oleh purata nilai tripliket ($n=3$) ± S.E.M.

jalur protein meningkat daripada 68805 ± 6300.321 (tanpa infeksi) kepada 84150 ± 5600.286 (terinfeksi-*P. berghei*) iaitu sebanyak 22.3% (signifikan dengan $p < 0.05$). Nilai keamatan jalur protein imunoreaktif-MAP kinase 42 kDa pula meningkat daripada 49375 ± 6187.184 (tanpa infeksi) kepada 60000 ± 15909.9 (terinfeksi *P. berghei*) sebanyak 21.5% (signifikan dengan $p < 0.05$) (Jadual 1). Semasa proses persampelan, darah daripada setiap tiga ekor mencit terinfeksi-*P. berghei* dan kawalan tanpa infeksi masing-masing disatukan menjadi satu sampel ($n=3$) bagi mendapatkan jumlah protein yang cukup untuk analisis. Tripliket ($n=3 \times 3$) dilakukan semasa proses persampelan bagi meningkatkan lagi kejutuan hasil analisis protein yang diperolehi. Selain itu, kepekatan protein jumlah telah ditetapkan iaitu sebanyak 20 μg bagi setiap replikat semasa memuatkan sampel protein ke dalam telaga gel poliakrilamida. Perubahan aras relatif kedua-dua protein imunoreaktif-MAP kinase tersebut semasa infeksi berbanding kawalan tanpa infeksi adalah tidak dipengaruhi oleh faktor-faktor lain seperti keadaan bilik makmal, jantina, umur dan strain mencit. Ini kerana bagi tujuan kajian *in vivo* tersebut, suhu bilik makmal haiwan ditetapkan pada 27°C manakala mencit yang digunakan ialah mencit jantan berumur 6 minggu daripada strain HSD.

Antibodi monoklon anti-MAP kinase (ERK1/2 tak terfosfat) yang digunakan dalam kajian ini bertindak balas secara spesifik dengan MAP kinase (ERK-1 dan ERK-2 dengan saiz 44 kDa dan 42 kDa masing-masing) tak

terfosfat. Perubahan nilai keamatan relatif pada jalur-jalur protein imunoreaktif-MAP kinase eritrosit tersebut semasa infeksi mungkin berkaitan dengan pengekspressan protein MAP kinase (ERK1/2) eritrosit bagi tujuan kepentingan parasit. Fenomena manipulasi mekanisme transduksi isyarat perumah juga pernah berlaku semasa infeksi parasit *Theileria* (Dobbelaere & Kuenzi 2004). *Theileria* merupakan parasit *Apicomplexa* yang menginfeksi beruang dan lembu. *T. parva* dilaporkan menginfeksi sel B dan T manakala *T. annulata* menginfeksi sel B dan makrofaj (Dobbelaere & Kuenzi 2004). Salah satu mekanisme pengisyratan perumah teraktif semasa infeksi *Theileria* ialah tapak jalan JNK iaitu merupakan salah satu daripada kumpulan MAP kinase eukariot selain daripada p38 dan ERK. Pengaktifan tapak jalan JNK ini membawa kepada pengawalan faktor transkripsi AP1 seterusnya proses proliferasi (Chaussepied et al. 1998). Faktor transkripsi yang lain yang diaktifkan oleh *Theileria* ialah c-Myc akibat rangsangan tapak jalan pengisyratan JAK2/STAT3. Peningkatan aras c-Myc menyumbang kepada pencegahan daripada berlakunya proses apoptosis perumah yang boleh mengganggu kemandirian parasit tersebut (Dessaugue et al. 2005). Sementara itu, parasit *Toxoplasma gondii* turut memanipulasikan tapak jalan pengisyratan NF- κ B makrofaj perumah semasa infeksi. Pengaktifan tapak jalan tersebut adalah berkaitan dengan modulasi mekanisme pengisyratan MAPK ERK1/2 perumah (Denkers et al. 2004). Kesemua kajian Dobbelaere & Kuenzi (2004), Chaussepied et al. (1998) dan Dessaugue et al. (2005) telah melaporkan

JADUAL 1. Analisis statistik ke atas nilai keamatan relatif jalur protein imunoreaktif-MAP kinase berberat molekul 42 kDa dan 44 kDa. Data merupakan purata nilai tiga bacaan \pm S.E.M. Perubahan nilai yang signifikan diwakili oleh $P < 0.05$

Berat molekul (kDa)	Nilai keamatan relatif (Terinfeksi)	Nilai keamatan relatif (Tanpa infeksi)	Ujian T berpasangan	Peratus perubahan nilai keamatan relatif
42	60000 \pm 15909.9	49375 \pm 6187.18	$P < 0.05$	+21.5%
44	84150 \pm 5600.29	68805 \pm 6300.32	$P < 0.05$	+22.3%

bahawa infeksi parasit menyebabkan pengaktifan mekanisme transduksi isyarat perumah. Bagaimana pun kajian kali ini hanya melaporkan perubahan tahap pengekspressan MAP kinase perumah semasa infeksi parasit kerana antibodi primer yang digunakan iaitu anti-MAP kinase (ERK1/2 tak terfosfat) monoklon hanya mengesan aras MAP kinase eritrosit yang tidak teraktif.

Modulasi pengisyratan MAP kinase eritrosit berlaku semasa infeksi *P. berghei*. Hasil kajian ini menyokong kajian-kajian lepas seperti Dobbelaere & Kuenzi (2004) dan Denkers et al. (2004) yang masing-masing melaporkan bahawa parasit intrasel didapati memanipulasikan mekanisme pengisyratan perumah bagi mengekalkan kemandiriannya. Bagaimanapun, samada kesan infeksi *P. berghei* (70% parasitemia) ke atas pengisyratan MAP kinase perumah ini berkaitan dengan pengaktifan enzim ini perlu dikaji dengan lebih lanjut.

PENGHARGAAN

Geran penyelidikan 02-01-02-SF0204 dan skim *National Science Fellowship* (NSF) dari Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi telah membiayai penyelidikan ini.

RUJUKAN

- Bavil, A.A., Hayes, S., Goretzki, L., Kroger, M., Anders, J. & Hendriks, R. 2004. Convenient and versatile subcellular extraction procedure, that facilitates classical protein expression profiling and functional protein analysis. *Proteomics* 4: 1397-1405.
- Berman, K., Cobb, M.H., Gibson, T.B., Karandikar, M., Pearson, G., Robinson, F. & Xu, B.E. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 22: 153-183.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chaussepied, M., Lallemand, D., Moreau, M.F., Adamson, R., Hall, R. & Langsley, G. 1998. Upregulation of Jun and Fos family members and permanent JNK activity lead to constitutive AP-1 activation in *Theileria*-transformed leukocytes. *Molecular & Biochemical Parasitology* 94: 215-226.
- David, A.F., Phillips, J.R., Simon, L.C., Reto, B. & Solomon, N. 2004. Antimalarial drug discovery: Efficacy models for compound screening. *Nature Reviews* 3: 509-520.
- Denkers, E.Y., Butcher, B.A., Del Rio, L. & Kim, L. 2004. Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear

- factor-kappa β -signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. *Immunology Review* 201: 191-205.
- Dessaige, F., Hilaly, S., Baumgartner, M., Blumen, B., Werling, D. & Langsley, G. 2005. c-Myc activation by *Theileria* parasites promotes survival of infected B-lymphocytes. *Oncogene* 24: 1075-1083.
- Dobbelaere, D.A. & Kuenzi, P. 2004. The strategies of *Theileria* parasite: A new twist in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Immunology* 16: 524-530.
- Doerig, C. 2004. Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy. *Biochemica et Biophysica Acta* 1697: 155-168.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A. & Grodsky, G.M. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Review* 23: 599-622.
- Field, J.W. & Shute, P.G. 1955. The microscopy diagnosis of human malaria: II-A morphological study of the erythrocytic parasites. *Studies from the Institute For Medical Research Federation of Malaya* (4). Hlm. 93-129. Kuala Lumpur: The Government Press.
- Frantzen, F., Grimsrud, K., Heggli, D.E. & Sundrehagen, E. 1997. Selective precipitation of human hemoglobin by organic solvents and metal cations. *Hemoglobin* 21: 155-172.
- Hall, B.S., Daramola O.O., Barden, G. & Targett, G.A. 1997. Modulation of protein kinase C activity in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Blood* 89: 1770-1778.
- Jiang, L., He, L. & Fountoulakis, M. 2004. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A* 1023: 317-320.
- Johnson, G.L. & Lapadat, R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912.
- Jones, G.L. & Edmundson, H.M. 1990. Protein phosphorylation during asexual life cycle of the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemica et Biophysica Acta* 1053: 118-124.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 341: 152-154.
- Laurent, D. 2006. Antimalarial potential of xestoquinone, a protein kinase inhibitor isolated from a Vanuatu marine sponge *Xestospongia*. *Bioorganic and Medical Chemistry* 14: 4477-4482.
- Liao, P., Georgakopoulos, D. & Kovacs, A. 2001. The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy *Proceeding of National Academy Science United States of America* 98: 12283-12288

- Macpherson, G.G., Warrel, M.J., White, N.J., Looareesuwan, S. & Warrell, D.A. 1985. Human cerebral malaria: A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *American Journal of Pathology* 119: 385-401.
- Phillips, R.S. 1983. *Studies in biology no. 152 malaria*. First edition. Edward Arnold (Publisher) Limited.
- Roberts, P.J. & Der, C.J. 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291-3310.
- Thomas, V. 1983. Parasitologi perubatan. First Edition. Kuala Lumpur: Dewan Bahasa Pustaka.
- Thurston, J.P. 1953. Parasitological reviews: *Plasmodium berghei*. *Experimental Parasitology* 2: 311-332.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 4350-4354.
- Mohd Fakhurul Zaman Raja Yahya
Pusat Pengajian Bioperubatan & Kesihatan
Kolej Universiti Kejururawatan & Kesihatan Masterskill
43200 Cheras, Selangor Darul Ehsan, Malaysia
- Hasidah Mohd Sidek*
Pusat Pengajian Biosains & Bioteknologi
Fakulti Sains & Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia
- *Pengarang untuk surat-menyurat; email: hasidah@ukm.my

Diserahkan: 24 Jun 2008

Diterima: 12 Mac 2009