



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Pós-Graduação em Patologia Molecular

Proteômica funcional da calmodulina na diferenciação dos merozoítos e na invasão eritrocitária de *Plasmodium falciparum*

Ana Caroline Ribeiro de Toledo Pinto

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Brasília, março de 2018.



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Pós-Graduação em Patologia Molecular

Proteômica funcional da calmodulina na diferenciação dos merozoítos e na invasão eritrocitária de *Plasmodium falciparum*

Ana Caroline Ribeiro de Toledo Pinto

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Brasília, março de 2018.

À minha “rimã”, Ingrid:

Gui, passamos por muita coisa juntas.

E tínhamos a opção de ficarmos apenas com dó de nós mesmas.

E decidimos seguir em frente.

Tenho muito orgulho da mulher incrível que você se tornou.

E tenho certeza de que a mamãe, onde quer que ela esteja, também tem.

Amo você.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo carinho e apoio às minhas escolhas. Em especial ao tio Marco, por tanto amor e dedicação. Aos meus irmãos, meus maiores amores.

Aos colegas do LBQP, por uma década de aprendizado e companheirismo, desde minha Iniciação Científica até o Doutorado. Aos demais colegas do Instituto de Biologia, minha segunda casa (por muitas vezes a primeira) desde agosto de 2006. Levo todos os professores, técnicos e colegas que passaram na minha vida com muito carinho na memória e no coração. Um abraço especial também aos colegas do Grupo Malária Molecular, em especial ao meu orientador: essa tese é nossa!

Aos nobres colegas da Polícia Civil do DF, que me acolheram tão bem e que, assim como eu, têm muito orgulho da profissão que exercem. Em especial, agradeço aos colegas do Instituto de Identificação por todo o apoio, cordialidade e apreço. Obrigada por fazerem essa transição entre meus mundos ser tão agradável, e por me darem espaço para minha “veia acadêmica” ainda pulsar.

Aos amigos, pelos abraços, conselhos, chocolates e cervejas, todas em horas precisamente necessárias. Agradeço em especial: Lilian Pelli, David Neves, Amanda Rosa, Raisa Latorraca, Rayner Myr, Elaine Nogueira, Nancy Rodrigues, Ana Paula Machado, Tânia Gimenes, Gleici Duarte, Rodrigo Carletti, Padu Rodrigues, Aline Martins, Rafael Del Sarto, Ju Vieira, Aline Guimarães, Alessandra Pelegrini, Raphaela Menezes, Reynaldo Magalhães.

Ao Rodrigo Monteiro. Por ser um exemplo de retidão de caráter, de perseverança e profissionalismo. Pelas risadas (e são muitas), pelos puxões de orelha (são muitos também), por ser minha fonte inesgotável de memes, pelas borboletas que criaram morada em meu estômago, e por ser o meu grande parceiro nessa jornada em que nos encontramos.

*you tell me to quiet down cause
my opinions make me less beautiful
but I was not made with a fire in my belly
so I could be put on
I was not made with a lightness in my tongue
so I could be easy to swallow
I was made heavy
half blade and half silk
difficult to forget but
not easy for the mind to follow.*

Rupi Kaur

APOIO FINANCEIRO

Essa tese foi desenvolvida com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que concedeu a bolsa de estudos, ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, que auxiliou financeiramente o estágio no *Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications – LORIA* (França), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), *et du Comité Français d'Évaluation de la Coopération Universitaire et Scientifique avec le Brésil* (COFECUB).

RESUMO

INTRODUÇÃO: Malária ainda é considerada um grande desafio para a saúde pública; e foi responsável por aproximadamente 438.000 mortes em 2015. *Plasmodium falciparum* transmite a forma mais complicada da malária em humanos, a malária cerebral. O ciclo intraeritrocitário é o responsável pelo crescimento exponencial da infecção no hospedeiro vertebrado e, conseqüentemente, pelos sintomas clínicos da doença, o que torna essa etapa um interessante alvo para drogas de combate à doença. Calmodulina (CaM) é um sensor de cálcio ubíquo, importante para sinalização celular. A interação entre CaM e suas parceiras (CBPs) podem ser também essenciais para os processos em *P. falciparum*, o que torna essas interações interessantes alvos terapêuticos. **OBJETIVOS:** combinar estratégias bioinformáticas e experimentais para estudo da interação entre PfCaM e suas parceiras, para elucidar novos alvos para o combate à malária. **MÉTODOS:** Foi realizada um *screening* virtual baseado no princípio de *cross-reference species*, visando encontrar parceiros de PfCaM ao estudar suas interações em outras espécies. PfCaM foi expressa heterologicamente e purificada por cromatografia do tipo IMAC, eluída com 100mM de imidazol. A cultura de *P. falciparum* foi enriquecida na fase esquizonte para se estudar as interações feitas por PfCaM, e essa amostra foi usada para ensaios de cromatografia de afinidade à calmodulina e BN-PAGE. **RESULTADOS:** O *screening* virtual teve como melhor resultado de CBP para posterior análise a proteína Hsp70-x, a sequência contém um peptídeo conservado na família Hsp70 descrito como ligante à CaM. A expressão heteróloga e purificação de PfCaM foi bem-sucedida, e a proteína está apta para posteriores ensaios de PPI. A interação entre PfCaM e Hsp70-x foi encontrada na cromatografia de afinidade; além disso, interações entre PfCaM e importantes moléculas efetoras que foram encontradas na cromatografia de afinidade foram discutidas. A cromatografia de afinidade à calmodulina mostrou-se uma estratégia interessante para se estudar os parceiros de PfCaM, além de colocar PfCaM como potencial regulador de importantes moléculas efetoras envolvidas na invasão de novas hemácias. A abordagem BN-PAGE foi estabelecida para estudar os complexos em *P. falciparum*. **CONCLUSÕES:** a combinação de estratégias bioinformáticas e experimentais mostrou-se uma boa estratégia para se elucidar interações entre proteínas em *P. falciparum*. Espera-se com esse trabalho ter destacado importantes interações com potencial para alvos terapêuticos visando o combate da malária.

ABSTRACT

BACKGROUND: Malaria is still a big challenge for public health; it was responsible for about 438.000 deaths in 2015. *Plasmodium falciparum* transmits cerebral malaria, the most severe complication related to a *Plasmodium spp.* infection in humans. The asexual intraerythrocytic cycle is responsible for increasing infection and, consequently, for clinical symptoms of malaria, reason why it is a target for drug development. Calmodulin (CaM) is a ubiquitous calcium sensor, responsible for important cell signaling processes. Since its structure is conserved among eukaryotes, CaM-binding proteins (CBPs) can be also essential for these processes in *Plasmodium spp.* and, for consequence, good drug targets. **AIM:** to combine bioinformatical and experimental approaches aiming at studying the interaction between PfCaM and its partners, to elucidate new drug targets to fight against malaria. **METHODS:** a virtual screening based on cross-reference species information was made, to predict CBPs in *P. falciparum*. PfCaM was heterologously expressed and purified by IMAC chromatography, eluted with 100mM of imidazole. A *P. falciparum* cellular culture was enriched in schizont phase, and the final sample was used to perform CaM-affinity chromatography and BN-PAGE approaches; **RESULTS:** The virtual screening has predicted *P. falciparum*'s HSP70x as a potential CBP; PfHsp70-x sequence contains calmodulin-binding peptides already described in literature. Heterologous PfCaM was successfully expressed and purified and can perform further PPI assays. It was found an indicative of interaction between PfCaM and PfHsp 70-x by CaM-affinity chromatography; besides, interactions between PfCaM and important molecular effectors involved in invasion of new cells were discussed. Chromatography approach has shown to be an interesting methodology to infer *P. falciparum* calmodulin-binding partners and pointed PfCaM as a potential regulator of important molecular effectors involved in erythrocyte invasion. BN-PAGE approach was established to study *P. falciparum* protein complexes. **CONCLUSIONS:** Combined experimental and *in silico* approaches seem to be a good strategy to evaluate protein-protein interactions. At the end of this work, we aim at having good potential drug targets for further studies in malaria disease.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Densidade da distribuição dos casos de malária no mundo.
- Figura 2.** Casos e mortes relacionadas à malária, estimados por região pela OMS, entre 2000 e 2015.
- Figura 3.** Padrão de distribuição da malária nas Américas, de acordo com levantamento feito pela OMS.
- Figura 4.** Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum* no hospedeiro vertebrado (humano) e no mosquito.
- Figura 5.** Estrutura tridimensional da calmodulina.
- Figura 6.** Exemplos de interação entre a calmodulina humana e algumas parceiras.
- Figura 7.** Principais mecanismos de ativação de proteínas-alvo pela calmodulina.
- Figura 8.** HumCaM e PfCaM compartilham alta porcentagem de identidade nas estruturas primária e tridimensional.
- Figura 9.** Análise e comparação das sequências primárias de PfCaM e das proteínas preditas como *calmodulina-related* no genoma de *P. falciparum*.
- Figura 10.** Localização da calmodulina no estágio esquizonte (lado esquerdo) e no merozoíto (lado direito).
- Figura 11.** *Data mining* da abordagem bioinformática, mostrando todas as etapas até chegar na(s) possível(is) candidata(s) a estudos posteriores de interação com calmodulina em *P. falciparum*.
- Figura 12.** Mapa do vetor pET100/D-TOPO[®], plasmídeo de expressão utilizado nesse estudo.

Figura 13. Construção do plasmídeo para expressão heteróloga de PfCaM em vetor pET TOPO® (Thermo®).

Figura 14. Análise da relação evolutiva entre as espécies elencadas para análise de interatoma e PfCaM.

Figura 15. Infográfico que resume a estratégia de *data mining* utilizada na abordagem de *cross-reference species*.

Figura 16. Estrutura genérica dos membros da família Hsp70.

Figura 17. Alinhamento entre as sequências primárias das quatro proteoformas de Hsp70 que apareceram na análise de *cross reference species*.

Figura 18. Alinhamento entre as sequências de Hsp70-x de *Plasmodium falciparum* e Hsp70 de *Mus musculus* e *Maize maize*.

Figura 19. Expressão heteróloga de CaM em BL21-AI™: gel SDS-PAGE 12%.

Figura 20. Resumo da purificação da calmodulina por cromatografia de afinidade à níquel.

Figura 21. Análise de complexos proteicos solúveis da forma esquizonte de *P. falciparum* por BN-PAGE.

Figura 22. Alinhamento entre PfCaM e CaM de *Bos taurus* (calmodulina bovina).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais padrões das sequências de proteínas ligantes de calmodulina.

Tabela 2. Lista de proteínas preditas e experimentalmente descritas que interagem com PfCaM.

Tabela 3. Famílias Pfam registradas no PDB que interagem com o domínio *EF-hand*, que compõe a estrutura tridimensional da calmodulina.

Tabela 4. Relação das espécies encontradas com interatomos experimentalmente descritos e seus respectivos bancos de dados de interação.

Tabela 5. Parceiras da calmodulina descritas experimentalmente em *S. cerevisiae* que possuem correspondentes ortólogos em *P. falciparum*.

Tabela 6. Parceiras da calmodulina descritas experimentalmente em *S. pombe* que possuem correspondentes ortólogos em *P. falciparum*.

Tabela 7. Verificação da fonte de evidência das proteínas ortólogas de *P. falciparum* resultantes da análise de *cross-reference species*.

Tabela 8. Proteínas identificadas no experimento de Cromatografia de Afinidade à Calmodulina.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACT:** *artemisinin-based combination therapy*
- IC₅₀:** *half maximum inhibitory concentration*
- UFR:** *unfolded protein response*
- OMS:** Organização Mundial da Saúde
- PVM:** *parasitophorous vacuolar membrane*
- PV:** *parasitophorous vacuole*
- pH:** potencial hidrogeniônico
- CaM:** calmodulina
- PfCaM:** calmodulina *Plasmodium falciparum*
- HumCaM:** calmodulina humana
- Y2H:** *yeast two hybrid assay*
- RPMI medium:** *Roswell Park Memorial Institute medium*
- PBS:** *Phosphate-buffered saline*
- EGTA:** *egtazic acid*
- EDTA:** *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- DTT:** dithiothreitol
- IAA:** iodoacetamida
- TFA:** *trifluoroacetic acid*
- nanoLC:** *nano liquid chromatography*
- MS:** *mass spectrometry*
- DDA:** *data-dependent acquisition*
- CID:** *collision-induced dissociation*
- ppm:** partes por milhão
- Da:** dalton

FDR: *false discovery rate*

CBPs: *calmodulin-binding proteins*

HA: hemaglutinina

LB: Meio Luria-Bertani

FPLC: *fast protein liquid chromatography*

PDB: *Protein Data Bank*

DDIs: *domain-domain interactions*

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

PPIs: *protein-protein interactions*

NBD: *nucleotide-binding domain*

SBD: *substrate-binding domain*

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Por que estudar malária: o problema da malária no mundo</i>	1
1.2	<i>Malária no Brasil</i>	4
1.3	<i>Biologia do parasito</i>	5
1.4	<i>Calmodulina – CALcium MODulated Protein</i>	8
1.5	<i>Calmodulina em Plasmodium falciparum</i>	12
2	JUSTIFICATIVAS.....	18
3	OBJETIVOS	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	<i>Abordagem in silico: investigação de possíveis parceiros da calmodulina por cross-species comparison:</i>	20
4.1.1	<i>Procura por espécie próxima filogeneticamente</i>	20
4.1.2	<i>Lista de possíveis parceiros da calmodulina em Plasmodium falciparum</i>	20
4.1.3	<i>Análise das CBPs com ortólogos em Plasmodium falciparum</i>	20
4.2	<i>Abordagens experimentais: busca de parceiros de PfCaM</i>	21
4.2.1	<i>Microrganismos, hemocomponentes e manutenção da cultura de protozoários</i> ..	21
4.2.1.1	<i>Cultura de parasitos</i>	22
4.2.1.2	<i>Sincronização do ciclo intraeritrocitário por sorbitol</i>	22
4.2.1.3	<i>Extração dos parasitos por lise eritrocitária seletiva</i>	23
4.2.2	<i>Cromatografia de afinidade à calmodulina</i>	23
4.2.2.1	<i>Preparação da resina Sepharose 4B – CaM</i>	23
4.2.2.2	<i>Preparação da amostra</i>	24
4.2.2.3	<i>Lavagens e eluições</i>	24
4.2.3	<i>Análise das frações por Espectrometria de Massas do tipo LC-MS/MS</i>	24
4.2.3.1	<i>Preparo da amostra</i>	24
4.2.3.2	<i>Cromatografia e Espectrometria de Massas</i>	25
4.2.3.3	<i>Análise dos dados</i>	27
4.2.4	<i>Expressão heteróloga de proteínas recombinantes de P. falciparum</i>	27
4.2.4.1	<i>Obtenção dos plasmídeos de expressão</i>	27
4.2.4.2	<i>Transformação bacteriana</i>	29
4.2.4.3	<i>Indução da expressão de proteínas em bactérias transformadas</i>	29

4.2.4.4	<i>Purificação das proteínas recombinantes</i>	29
4.2.4.4.1	<i>Lise das bactérias</i>	29
4.2.4.5	<i>Purificação de PfCaM por Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC)</i>	30
4.2.5	<i>BN-PAGE</i>	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	<i>Investigação de possíveis parceiros da calmodulina por cross-reference species</i>	32
5.1.1	<i>Screening inicial de potenciais domínios Pfam que interagem com CaM</i>	32
5.1.2	<i>Procura por espécies filogeneticamente relacionadas</i>	34
5.1.3	<i>Investigação de possíveis parceiros da calmodulina em P. falciparum</i>	38
5.1.4	<i>Família Hsp70</i>	48
5.1.5	<i>Hsp70-x</i>	51
5.2	<i>Expressão heteróloga de proteínas recombinantes de P. falciparum</i>	53
5.2.1	<i>Calmodulina</i>	53
5.3	<i>Blue-Native PAGE como estratégia para estudo dos complexos de PfCaM</i>	54
5.4	<i>Estabelecimento de protocolo de Cromatografia de Afinidade à Calmodulina para estudo das interações de PfCaM</i>	55
6	CONCLUSÕES	62
7	PERSPECTIVAS	63
8	BIBLIOGRAFIA	64
9	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Por que estudar malária: o problema da malária no mundo

O termo malária deriva do italiano *mal'aria* (“ar ruim”, em tradução livre), e pacientes com sintomas semelhantes aos manifestados pela malária podem ser encontrados em relatos muito antigos, alguns que datam de 2700 a.C. No entanto, foi apenas em 1880 que o parasito causador da doença foi revelado pela primeira vez, pelo médico militar Alphonse Laveran, que observou no microscópio “elementos” que se moviam com grande energia no sangue de pacientes que contraíram malária. Seus estudos sobre o assunto renderam a ele o Nobel de Medicina ou Fisiologia em 1907.

Embora seja uma doença descrita há tanto tempo, o combate ao agente causador da malária e ao mosquito vetor da doença ainda são um grande desafio para a saúde pública. De acordo com o *World Malaria Report* de 2014¹, existem 3,3 bilhões de pessoas em 97 países ainda sob risco de contrair a malária, e 1,2 bilhão dessas pessoas estão sob alto risco (uma chance em 1000) de contrair a doença, a grande maioria no continente africano. A morte de crianças abaixo de cinco anos ainda é a maior preocupação, já que representa 78% das mortes nessa região¹. O mapa de distribuição da doença no mundo está representado na Figura 1.

O *World Malaria Report* de 2015 traz uma pesquisa robusta com os dados de incidência e combate da malária entre 2000 e 2015: a incidência de malária teve uma queda estimada em 37%, levando em conta o crescimento populacional; a morbidade relacionada à malária teve um decréscimo de 60% no mesmo período². Os dados estimados foram organizados na Figura 2.

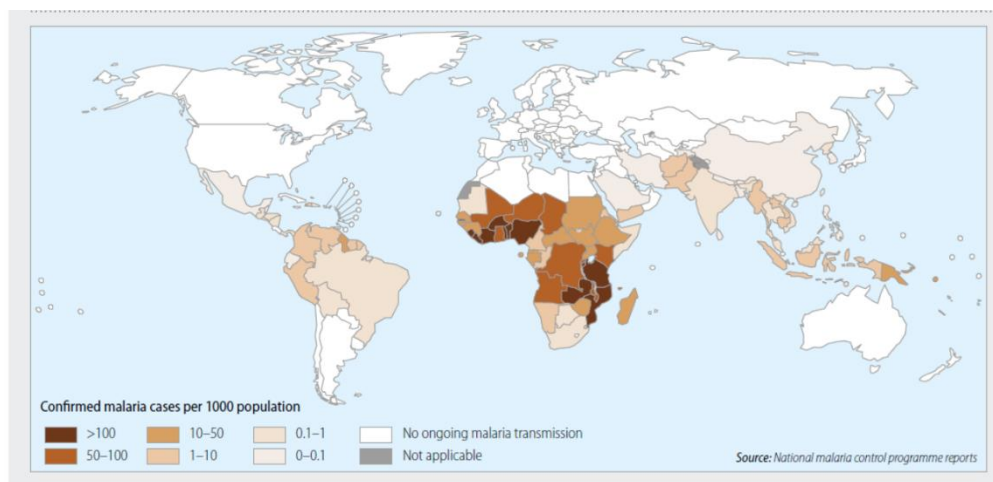


Figura 1. Densidade da distribuição dos casos de malária no mundo; as cores mostram a proporção de casos a cada 1000 habitantes. Retirado de WHO Report¹, 2014.

WHO region	Estimated number of malaria cases (000's)				Change 2000–2015	Estimated number of malaria deaths				Change 2000–2015
	2000	2005	2010	2015		2000	2005	2010	2015	
African	214 000	217 000	209 000	188 000	-12%	764 000	670 000	499 000	395 000	-48%
Americas	2 500	1 800	1 100	660	-74%	1 600	1 200	1 100	500	-69%
Eastern Mediterranean	9 100	8 600	4 000	3 900	-57%	15 000	15 000	7 000	6 800	-51%
European*	36	5.6	0.2	0	-100%	0	0	0	0	
South-East Asia	33 000	34 000	28 000	20 000	-39%	51 000	48 000	44 000	32 000	-37%
Western Pacific	3 700	2 300	1 700	1 500	-59%	8 100	4 200	3 500	3 200	-60%
World	262 000	264 000	243 000	214 000	-18%	839 000	738 000	554 000	438 000	-48%
Lower bound	205 000	203 000	190 000	149 000		653 000	522 000	362 000	236 000	
Upper bound	316 000	313 000	285 000	303 000		1 099 000	961 000	741 000	635 000	

* There were no recorded deaths among indigenous cases in WHO European Region for the years shown.
Source: WHO estimates

Figura 2. Casos e mortes relacionadas à malária, estimados por região pela OMS, entre 2000 e 2015. Retirado de *World Malaria Report*².

Um dos grandes desafios relacionados ao combate da malária é a relativa facilidade com o que o parasito adquire resistência a medicamentos, mesmo com a evolução da política de tratamento da doença. Um dos principais motivos do aumento de resistência é o uso indiscriminado de medicação antimalárica por falta de diagnóstico correto da doença³, muitas vezes por falta de estrutura física adequada, ou por quimioprofilaxia por longos períodos de tempo, o que acelera

o processo de seleção de linhagens resistentes e também interfere no processo natural de imunidade adquirida da população⁴. Esse cenário é muito comum no continente africano, que possui o maior percentual de pessoas infectadas com malária.

Para prevenir ou retardar ao máximo a resistência do parasito aos quimioterápicos, adotou-se a terapia combinada como forma de combate, em que pelo menos dois compostos com efeito antimalárico com diferentes mecanismos de ação são administrados ao paciente³. Antigamente, o tratamento consistia em uma abordagem monoterápica com drogas como a cloroquina, amodiaquina ou a sulfadoxina-pirimetamina. Atualmente a abordagem é por terapia combinada à base de artemisina (ACT, *artemisinin-based combination therapy*); essa abordagem possui baixo nível de toxicidade e é bem tolerada pelo organismo, e tem contribuído para a redução da morbidade da malária no mundo³. O tratamento quimioterápico também tem função preventiva em locais com epidemia de malária, principalmente em períodos do ano de maior incidência da doença e em grupos de risco (grávidas e crianças)⁴. Vale ressaltar que cada espécie tem suas particularidades de tratamento, e que a abordagem ACT é recomendada para tratamento da doença transmitida por *Plasmodium falciparum*, embora também seja eficaz contra estágios eritrocitários de outras espécies transmissoras da malária em humanos.

Os mecanismos de resistência a anti-maláricos estão normalmente relacionados a polimorfismos de proteínas de transporte no parasito, que costumam expulsar os fármacos para fora da célula, num mecanismo de resistência semelhante ao descrito para algumas células cancerosas em humanos⁵. Com relação ao tratamento mais recente, abordagem ACT, já existem relatos de aumento de resistência do parasito à artemisina e seus compostos derivados (principalmente o artesunato), vindos da região do sudeste da Ásia (entre o Camboja e a Tailândia), em que os compostos em questão têm levado mais tempo para diminuir a população de parasitos no paciente infectado do que o período padronizado pelo IC₅₀ da droga⁶; o mecanismo de resistência parece

estar associado com o aumento da expressão de proteínas relacionadas a estresse celular da via UFR (*unfolded protein response*, em inglês)⁷.

1.2 Malária no Brasil

O Brasil é responsável por 37% dos casos reportados de malária nas Américas em 2013 e, juntamente com a Venezuela e a Colômbia, são responsáveis por 77% dos casos reportados no continente²; nosso país também é responsável por praticamente metade das morte (39/79) reportadas em 2014² e metade das mortes (41/82) das mortes reportadas em 2013¹. O estado do Amazonas, juntamente com o estado de Bolivar (Venezuela) são as áreas mais afetadas com a doença². Mesmo assim, o Brasil foi um dos 15 países que conseguiu diminuir em 75% os casos de malária reportados entre 2000 e 2014². O padrão de distribuição da malária nas Américas é exemplificado na figura 3:

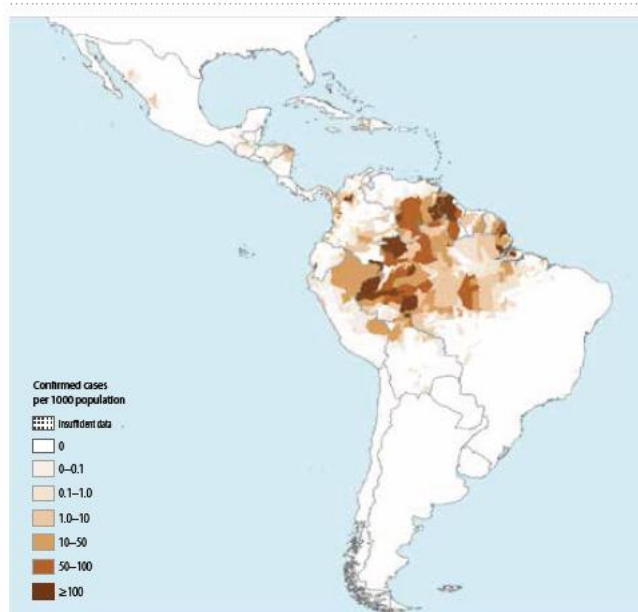


Figura 3. Padrão de distribuição da malária nas Américas, de acordo com levantamento feito pela OMS^{1,2}. Nota-se que a maior incidência de malária no país se restringe à região da Amazônia Legal: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins.

Um dos problemas comumente relatados na região da Amazônia Legal é a dificuldade em se diagnosticar rapidamente que o paciente está com malária.

Isso se dá, entre outros aspectos, pelo fato de os sintomas da doença (febre, calafrios, fraqueza) serem comuns de algumas viroses como a dengue⁸. Em geral, os casos de coinfeção de dengue e malária são relativamente comuns, tendo em vista que ambas as doenças têm distribuição geográfica semelhante do vetor^{8,9}. Em pacientes que contraíram as duas doenças os sintomas de ambas podem aparecer de maneira mais severa⁹. Esses aspectos, juntamente com os relacionados a falta de investimento e estrutura física do sistema de saúde, contribuem para a persistência da malária nessa região.

1.3 Biologia do parasito

A malária em humanos é causada por cinco espécies de parasitos pertencentes ao gênero *Plasmodium*. Dessas cinco, quatro são transmitidas de pessoa para pessoa por meio da picada de fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. ovale*. A quinta espécie, *P. knowlesi*, infecta normalmente primatas, mas existem casos descritos de transmissão zoonótica, em que mosquitos picam um primata infectado e posteriormente picam e infectam humanos². Não existem, porém, descrições de transmissão entre humanos de *P. knowlesi*.

O ciclo do parasito começa no momento em que fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* injetam a forma morfológica esporozoíto na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo. Esses esporozoíto invadem hepatócitos, se multiplicam por esquizogonia e saem na forma de merozoítos, que invadem hemácias. Cada esporozoíto que invade um hepatócito é capaz de produzir até 30.000 merozoítos entre 5-8 dias¹⁰.

O ciclo intraeritrocitário é um estágio assexuado em que há um crescimento exponencial do número de parasitos: cada protozoário que entra na hemácia pode dar origem em média a 16 merozoítos¹¹. Enquanto cresce dentro do eritrócito, o parasito se envolve em uma cavidade membranar conhecida como vacúolo parasitóforo (PVM, *parasitophorous vacuolar membrane* em inglês) e se alimenta de pequenas porções proteicas de hemoglobina da célula¹¹, modifica a

membrana dessa para facilitar a importação de nutrientes e para acrescentar antígenos críticos para fugir do sistema imune, e organiza o grupo heme da hemácia (tóxico para o parasito) na forma de um cristal biologicamente inerte e não tóxico conhecido como hemozoína^{10,11} que pode ser facilmente visto em microscópio de luz.

Os merozoítos, ao invadirem os eritrócitos, passam por uma série de modificações morfológicas: o parasito passa pelos estágios anel (0-20 horas) e trofozoíto - período de maior atividade metabólica do parasito (20-36 horas) até iniciar seu processo de multiplicação celular por esquizogonia: processo em que há primeiro a multiplicação dos núcleos sem a individualização das células, formando um estágio provisório chamado de sincício; no parasito essa forma é conhecida como esquizonte e dura entre 36 e 48 horas. Por fim, há a individualização dos merozoítos, que rompem a membrana do vacúolo parasitóforo e da hemácia num processo protease-dependente¹² e adentram a corrente sanguínea para invadir posteriormente novos eritrócitos. O ciclo intraeritrocitário tem um padrão para cada espécie: 48h para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, 72h para *P. malariae* e 24h para *P. knowlesi*.

Após três ou quatro ciclos intraeritrocitário, alguns parasitos se diferenciam nas formas sexuadas do parasito dentro da hemácia: microgametócito (gameta masculino) e macrogametócito (gameta feminino). Essas formas sexuadas podem ser ingeridas pelo mosquito em novo repasto sanguíneo, e é no vetor que a reprodução sexuada do parasito acontece: os gametócitos saem da hemácia e são estimulados a se desenvolverem em gametas no intestino médio do vetor¹³; esse estímulo parece estar ligado a um aumento de pH, da concentração de CO₂ e de bicarbonato¹⁴, e da presença de ácido xanturênico produzido pelo inseto. Os microgametas masculinos sofrem um processo denominado exflagelação, em que o parasito fica temporariamente octaplóide para rapidamente serem formados oito microgametas flagelados; esses gametas rapidamente vão em busca do macrogameta feminino para posterior fertilização¹³.

O zigoto resultante passa por um processo meiótico e resulta em quatro oocinetos móveis, que atravessa as camadas do intestino médio até atingir a lâmina basal do intestino e se diferenciar em oocisto¹³. Entre 10-14 dias esse oocisto crescerá e passará pelo processo de esporogonia que resulta em milhares de esporozoítos, forma infectiva do parasito¹³. Esses esporozoítos são liberados na hemolinfa do mosquito e especificamente invadem as glândulas salivares do animal, local onde ficam alocados até novo repasto sanguíneo do mosquito, que injeta parasitos no hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo¹³.

Cada etapa do ciclo de vida de *P. falciparum* tem seu potencial para ser alvo para fármacos de combate à malária. O ciclo intraeritrocitário é o mais estudado, por ser responsável pela patologia da doença e por ser o mais eficaz de se manter em cultura. Entretanto, o ciclo sexuado também tem um grande potencial, tendo em vista que as etapas que envolvem o ciclo sexuado são as que possuem a menor população de parasitos dentro de todo o ciclo de vida do protozoário, o que também torna essa etapa do ciclo uma excelente candidata a alvos de drogas para combate da malária¹³.

Resumidamente, as etapas do ciclo de vida de *Plasmodium falciparum* estão esquematizadas na figura 4:

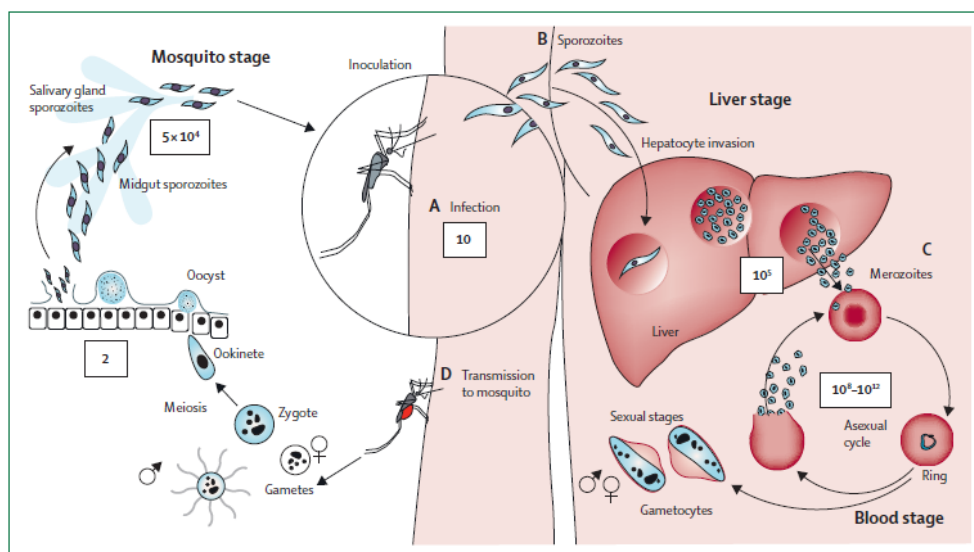


Figura 4. Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum* no hospedeiro vertebrado (humano) e no mosquito. Nota-se que ocorrem dois ciclos assexuados no hospedeiro vertebrado – hepático pré eritrocitário e intraeritrocitário, e que o ciclo sexuado acontece no vetor anofelino a partir da ingestão das formas sexuadas do parasito durante o repasto sanguíneo. Figura retirada de Rahmah *et al.*¹⁰.

1.4 Calmodulina – CALcium MODulated Protein

A calmodulina é uma proteína intracelular ubíqua, pequena (17kDa) e de natureza ácida que funciona como sinalizadora do aumento intracelular de cálcio, importante mensageiro secundário de diversos processos biológicos.

Essa proteína possui quatro motivos do tipo *EF-hand*, que possui alta afinidade por cálcio; cada um desses motivos possui duas alfas-hélices conectadas por um *loop* de 12 resíduos. Quando a concentração intracelular de cálcio aumenta para aproximadamente 1 μ M, há a ligação entre o íon e esses domínios da proteína: essa ligação muda a posição relativa das duas alfa-hélices, antes quase paralelas, para uma posição relativa quase perpendicular (*close-to-open conformation*). Essa ligação desencadeia toda uma mudança na estrutura tridimensional da proteína, que assume um formato conhecido como haltere (*dumbbell-shape*) em que as porções N e C-terminais da proteína assumem formato globular e são conectadas por uma longa alfa-hélice central flexível. Essa hélice central é bem flexível em solução e assume um formato não-hélice e mais estendido, o que permite a interação com proteínas de tamanhos distintos. A estrutura tridimensional da calmodulina associada ao cálcio, bem como a esquematização do domínio EF-hand estão esquematizados na Figura 5.

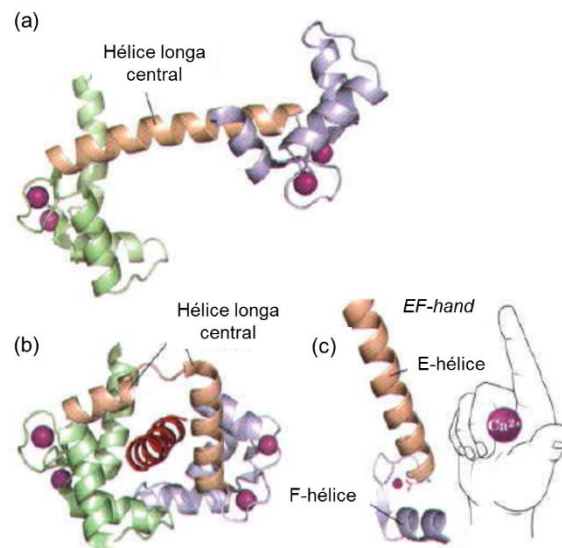


Figura 5. Estrutura tridimensional da calmodulina (PDB id.: 1CLL, calmodulina humana). (a) Estrutura cristalográfica da calmodulina mostrando os quatro íons cálcio (em roxo) em seus respectivos sítios de ligação, as porções N e C-terminal em conformação globular (em verde e roxo, respectivamente), ligados pela longa alfa-hélice em laranja. (b) Demonstração da flexibilidade da alfa-hélice, que a permite “abraçar” a proteína-alvo. (c) Demonstração do domínio *EF-hand*. Adaptado de Leninger¹⁵.

Outra mudança importante que ocorre com a ligação dos íons cálcio na estrutura da calmodulina é a exposição do bolsão hidrofóbico que existe em cada uma das regiões globulares da proteína. Esse bolsão é rodeado por resíduos de aminoácidos negativamente carregados e é rico em metioninas, o que contribui para a formação dessa superfície hidrofóbica^{16,17}. Em geral, os peptídeos de proteínas que interagem com a calmodulina possuem uma estrutura secundária em alfa-hélice com duas âncoras hidrofóbicas, que interagem com esses bolsões ricos em metionina¹⁷, além de resíduos positivamente carregados que interagem com o “anel” de resíduos negativamente carregados por interações eletrostáticas¹⁶.

Unindo a flexibilidade da alfa-hélice central e esse bolsão hidrofóbico de formato genérico, temos uma proteína sinalizadora que interage com uma variedade de proteínas-alvo de diversos tamanhos, sem que haja a necessidade de uma sequência específica. A calmodulina “abraça” suas proteínas-alvo

através da hélice central após o reconhecimento dessa: essa hélice se “desmancha”, permitindo que os dois lobos da calmodulina se aproximem e “enterrem” o peptídeo da proteína-alvo entre eles¹⁷. A flexibilidade da estrutura da calmodulina, que a permite interagir com uma enorme gama de proteínas, está exemplificada na Figura 6.

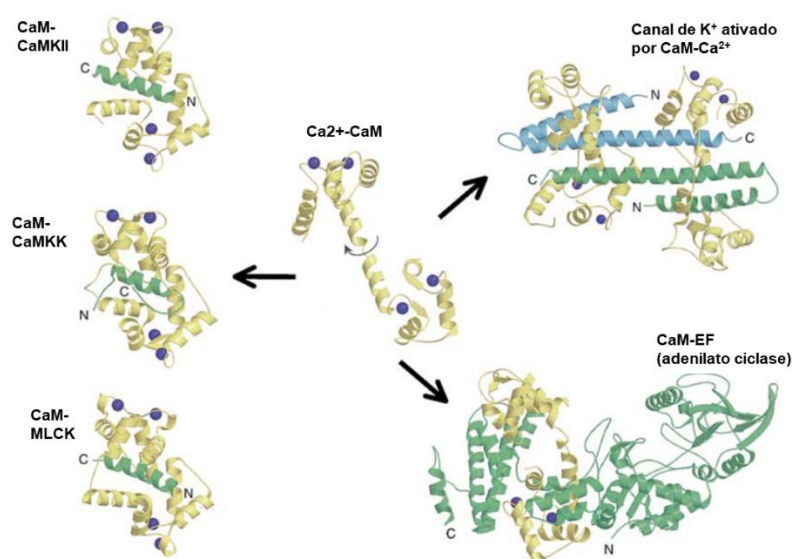


Figura 6. Exemplos de interação entre a calmodulina humana e algumas parceiras, destacando a flexibilidade da proteína – destaque para o rearranjo dos domínios EF-hand - para interagir com seus alvos, bem como a versatilidade das proteínas parceiras. Códigos de acesso das estruturas: Ca^{2+} -CaM ao centro: 1CLL, CaM-CaMKII (*calmodulin kinase II*): 1CDM, CaM-CaMKK (*calmodulin kinase kinase*): 1CKK, CaM-MLCK (*miosin light chain kinase*): 1CDL, Canal de K^+ ativado por CaM- Ca^{2+} : 1G4Y, CaM-EF (adenilato ciclase componente da toxina produzida por *Bacillus anthracis*): 1K93. Em todas as estruturas, CaM está em amarelo, e os íons cálcio estão destacados em azul. Figura adaptada de Hoeflich & Ikura¹⁸

Um dos maiores desafios em se determinar as proteínas ligantes de calmodulina é o fato de não haver consenso entre as sequências primárias dos peptídeos que interagem com a proteína em questão; o que se tem são peptídeos que compartilham similaridades bioquímicas e biofísicas, como estrutura secundária propensa à formação de α -hélice, carga residual positiva, moderada hidrofobicidade¹⁹. Baseada no número de resíduos que separam as

duas âncoras hidrofóbicas no peptídeo da proteína-alvo, foram determinados alguns padrões de identificação de sequências ligantes de calmodulina. Esses padrões são separados em dois grandes grupos, os Ca²⁺-dependentes e os Ca²⁺-independentes, e foram resumidos na Tabela 1:

Tabela 1. Principais padrões das sequências de proteínas ligantes de calmodulina. Os números nas sequências Ca²⁺-dependentes representam a posição em que é necessário um resíduo hidrofóbico. Os resíduos entre colchetes são as opções de resíduos que podem cumprir esse requisito; x, na sequência, pode ser substituído por qualquer aminoácido. O motivo IQ-like^a representa um motivo IQ que necessita de Ca²⁺ para interagir com a calmodulina.

Motivo	Sequência
Ca ²⁺ dependente	
1-10	[FILVW]xxxxxxxx[FILVW]
1-5-10	[FILVW]xxx[FAILVW]xxxx[FILVW]
Basic 1-5-10	[RK][RK][RK][FAILVW]xxx[FILV]xxxx[FILVW]
1-12	[FILVW]xxxxxxxxxx[FILVW]
1-14	[FILVW]xxxxxxxxxxx[FILVW]
1-8-14	[FILVW]xxxxxx[FAILVW]xxxxx[FILVW]
1-5-8-14	[FILVW]xxx[FAILVW]xx[FAILVW]xxxxx[FILVW]
Basic 1-8-14	[RK][RK][RK][FILVW]xxxxxx[FAILVW]xxxxx[FILVW]
1-16	[FILVW]xxxxxxxxxxxxxx[FILVW]
Ca ²⁺ independente	
IQ	[FILV]Qxxx[RK]Gxxx[RK]xx[FILVWY]
IQ-like ^a	[FILV]Qxxx[RK]xxxxxxxx
IQ-2A	[IVL]QxxxRxxxx[VL][KR]xW
IQ-2B	[IL]QxxCxxxxKxRxW
IQ não-convencional	[IVL]QxxxRxxxx[RK]xx[FILVWY]

Fonte: Adaptado de Mruk *et al.* ²⁰

Vale ressaltar que, embora exista essa classificação baseada em características bioquímicas e biofísicas em comum entre os ligantes de calmodulina, são relatadas também interações entre essa proteína e outros ligantes em que a região que interage não atende a nenhum dos critérios descritos acima. Nesses casos, a calmodulina pode interagir com motivos de tamanho maior (16 a 17 resíduos) ou até menores (6 resíduos) do que motivos clássicos descritos na Tabela 1, além de interagir com regiões que não necessariamente estão conformadas em α-hélice ^{18,20}.

Existem três principais mecanismos que envolvem a ativação da proteína-alvo pela CaM. A calmodulina pode interagir com algum domínio auto inibitório da proteína alvo, e a mudança conformacional resultante dessa interação desloca esse domínio da posição original, ativando assim a atividade da proteína-alvo. No segundo modelo, a interação entre CaM e a proteína-alvo estabiliza o sítio ativo da proteína, ativando-a. No terceiro modelo, CaM induz a dimerização de monômeros proteicos, e essa dimerização é responsável por ativar a proteínas-alvo. Esses modelos foram revisados por Hoeflich & Ikura¹⁸, e estão esquematizados na Figura 7:

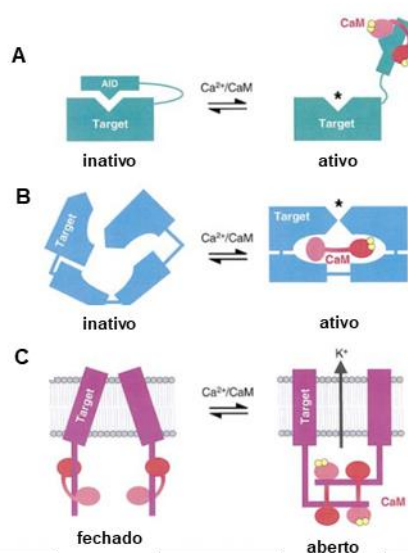


Figura 7. Principais mecanismos de ativação de proteínas-alvo pela calmodulina. (A) Remoção do domínio auto inibitório (*autoinhibitory domain displacement*), em que CaM interage com o domínio auto inibitório da proteína alvo (AID: *autoinhibitory domain*), ativando a proteína. (B) Remodelamento do sítio ativo (*active site remodeling*), em que a mudança conformacional resultante da interação entre CaM e a proteína alvo estabiliza o sítio ativo dessa. (C) Dimerização mediada por CaM, que ativa a estrutura resultante. Íons Ca^{2+} estão destacados em amarelo, e o sítio ativo das proteínas-alvo está destacado com um asterisco (*). Adaptado de Hoeflich & Ikura¹⁸.

1.5 Calmodulina em *Plasmodium falciparum*

Em *P. falciparum*, a calmodulina advém de um gene de 912bp, que se localiza no cromossomo 14 (acesso no PlasmoDB: PF3D7_1434200), com um

íntron ²¹. A proteína resultante é pequena: 149 resíduos, aproximadamente 17kDa. A estrutura de PfCaM é bem semelhante, tanto em sequência primária quanto em estrutura tridimensional, à calmodulina humana. Esses fatores estão detalhados na Figura 8.

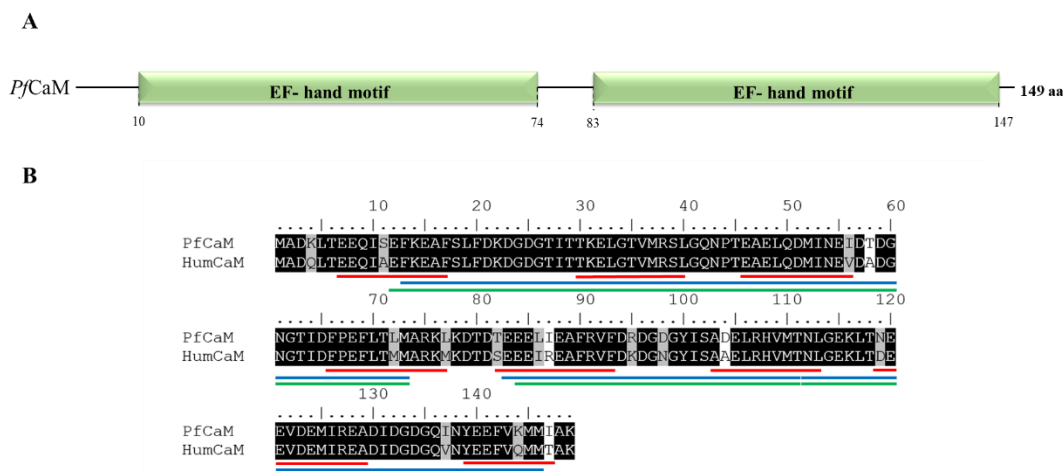


Figura 8. HumCaM e PfCaM compartilham alta porcentagem de identidade nas estruturas primária e tridimensional. (A) Estrutura primária da PfCaM, destacando a posição dos motivos *EF-hand* na estrutura primária da proteína. Os números nas pontas dos retângulos representam a posição dos aminoácidos na sequência primária. (B) Alinhamento de sequências entre PfCaM e HumCaM, feito no *software* ClustalW. Resíduos conservados entre as duas sequências estão destacados em preto, resíduos conservados estão destacados em cinza. As linhas em azul representam os motivos EF-hand de HumCaM, enquanto as linhas azuis representam os motivos EF-hand de PfCaM. As linhas vermelhas representam as estruturas secundárias α -hélice previstas para ambas as sequências pelo *software* PROMALS3D. Edição das sequências feitas pelo *software* BioEdit.

PfCaM é expressa nos estágios mais avançados do ciclo intraeritrocitário do parasito, e tem seu pico de transcrição em aproximadamente 30h pós invasão²². A proteína se localiza de maneira difusa no citoplasma do parasito, e se encontra concentrada na região apical (róprias) dos merozoítos.

O genoma de *P. falciparum* também possui proteínas que foram documentadas como *calmodulin-related*: duas proteínas do tipo CaM-like, com números de acesso PF3D7_0414200 e PF3D7_1444200, e três proteínas

classificadas como *putative CaM*, com números de acesso PF3D7_0714400, PF3D7_1030800 e PF3D7_1418300^{23,24}. Conforme demonstrado na Figura 9, essas proteínas têm baixa similaridade com a sequência primária de PfCaM. Em questão de estrutura secundária e formação de domínios, apenas duas delas (PF3D7-1418300 e PF3D7_1444200) possuem o domínio *EF-hand*, que compõe a estrutura terciária de PfCaM. Embora ainda não haja estudos sobre expressão e função dessas proteínas no parasito, esses dados reforçando a ideia de que esse possui apenas um gene funcional para calmodulina.

A

```

      10      20      30      40      50      60
CaM-like crom 14 MNEKPYIPIIEKLNNEKNPNFYICGNGYIAPLDIKNLK-KISNTEKKNLQRFESMMKKN
CaM-like crom 04 M-----SKYFLSKQRRAEIESIFKEYDTNK
CaM-like crom 04 M-----SKYFLSKQRRAEIESIFKEYDTNK
PfCaM          MAD-----KLTTEEQISEFKEAFLSFLFKKDG

      70      80      90      100     110     120
CaM-like crom 14 TCRISVCNLDHDLHRYNYKISKSEVERMTWEFDNMDNCLDYDPIYHLYLRCVNDKKKQV
CaM-like crom 04 DGVS-GERLLYLLRSLGIYLNKTESEVILEDYK--KNGNINLSDFEFLMKQYYFD----E
CaM-like crom 04 DGVS-GERLLYLLRSLGIYLNKTESEVILEDYK--KNGNINLSDFEFLMKQYYFD----E
PfCaM          DGTITTKELGTVMRSLGQNPTAELQDMINEIDTDGNGTIDFFPFLTLMARKLKD----T

      130     140     150     160     170     180
CaM-like crom 14 PSDLYNIQPFMFDYEMNGYITVEKTLQILLVYRFR--EKMDQEVQEIFG-DKYEDESGV
CaM-like crom 04 NIENLLYLSLQSYAQEKSKTINLNEFKNVLTL--GSGIKLTEEVDNFLNVEFNGYKKN-
CaM-like crom 04 NIENLLYLSLQSYAQEKSKTINLNEFKNVLTL--GSGIKLTEEVDNFLNVEFNGYKKN-
PfCaM          DTEEELEAFRVDRDGDGYISADELRHVMNTNL-GE--KLTNEEVDDEMIR-EADIDGDG-

      190     200     210
CaM-like crom 14 EKQIFLKEYLENEKKRIRKYRSENPKKGGKS
CaM-like crom 04 --EISFDDFIYKILKE-----
CaM-like crom 04 --EISFDDFIYKILKE-----
PfCaM          --QINYEELVKKMIAK-----

```

B

```

      10      20      30      40      50      60
CaM putative crom 14 M-----RIVDKQ--IKESALLARNFDFGHISNELLALRFLVESDYSLMEK---
CaM putative crom 10 MQ-----VNFPEDKIDLFEKNENLNNNDKKTSPPEFKILRVLQOTINEKDLDEIINK
CaM putative crom 07 MEYAGEEFQLTEYQIKKTIKARNYLQKKKGLKFDLLGSLRCSYINLSLKEVEKIKKE
PfCaM          MA-----DKLTTEEQISEFKEAFLSFLKDKDGGTITTKELGTVMRSLGQNPTAELQDMINE

      70      80      90      100     110     120
CaM putative crom 14 -----
CaM putative crom 10 HFED---GIEECDKEQKDNDE-----KNNKS--INSIKKYDIK-----
CaM putative crom 07 ILENKTLRKKDEQDEQVENEKRQDYENVKRRQEEENSLEDNLDNNEKEIRIQIKEQNNYIN
PfCaM          IDT-----

      130     140     150     160     170     180
CaM putative crom 14 -----SGATYSMNDYVKAKKHLG-AH
CaM putative crom 10 ----NSISKF-SNIKSNEEKQTQSLIKNKDHLNEKIINKKHINFEEELKIFMNIYT-QP
CaM putative crom 07 NEDDNNNISKLLSNLK-NYDNFMELEKQKELLRQEEENKNI FTIKEFRRIIQIDIINE
PfCaM          -----DNGTIDFFPFLTLMARKLK-DT

      190     200     210     220     230     240
CaM putative crom 14 TPKERTNSLKKMKNNNETISVDAIVHLVMTMSDILLTENDYRKFKKFVD---PESRNI
CaM putative crom 10 ISLHELKLYFQIPENENKYMDEKIKYLLMNSDEKIDEDFKFFLDSIN---FKNVDK
CaM putative crom 07 AKPINVLNAFEIPEEKGNSTISIKRERFLLQYLGEPLINVEFFEFFEIKTLDKVYKTDY
PfCaM          DTEEELEAFRVDRDGDGYISADELRHVMNTNLGEKLINEEVDDEMIREAD---IDGDGQ

      250
CaM putative crom 14 PLHFVFEKILS----
CaM putative crom 10 DYVILSKMINKLC--
CaM putative crom 07 IYEDLLINELINKDSNI
PfCaM          INYEELVKKMIAK----

```

Figura 9. Análise e comparação das sequências primárias de PfCaM e das proteínas preditas como *calmodulina-related* no genoma de *P. falciparum*. (A) Comparação entre a sequência de PfCaM e proteínas preditas como *calmodulina-like proteins*. (B) Comparação entre a sequência de PfCaM e as proteínas preditas como *putative calmodulin*. Em ambos os alinhamentos, as regiões em preto representam a conservação dos resíduos entre as sequências, e as regiões em cinza representam as mudanças conservadas de resíduos nas sequências.

Estudos já haviam demonstrado que o cálcio era de extrema importância para o desenvolvimento do parasito e para a invasão de novas células pelo merozoíto²⁵. Além disso, foi demonstrado também que alguns fármacos antagonistas de calmodulina funcionavam como bloqueadores em algumas culturas de *Plasmodium sp*^{26,27}. Com essas evidências, acreditou-se durante algum tempo que a calmodulina poderia ser um alvo interessante para o combate da malária.

Alguns estudos foram realizados e mostrou-se que as doses de inibidores de calmodulina capazes de matar os parasitos em cultura eram tóxicas para o organismo, alguns inclusive em concentrações com uma ordem de grandeza maior²⁸. Outra hipótese que foi refutada era a de que a calmodulina estava envolvida no aumento da resistência do parasito à cloroquina²¹. Robson e colaboradores²⁹ fizeram um estudo detalhado de modelagem da proteína e demonstraram que a alta identidade entre a calmodulina do protozoário e as calmodulina de mamíferos, além da grande similaridade entre as estruturas tridimensionais, impossibilitaria a diferenciação entre as duas proteínas caso um fármaco contra a calmodulina de *P. falciparum* fosse usada para frear a doença.

Não se pode deixar de levar em consideração, entretanto, a importância da calmodulina para o desenvolvimento do parasito. Foi mostrado através de radioimunoensaios que a concentração dessa proteína é crescente conforme o parasito se desenvolve, e culmina num acúmulo dela na região apical dos merozoítos, conforme mostrado na Figura 10. Wasserman e colaboradores²⁵ mostraram que a retirada do cálcio impede que o merozoíto invada novos eritrócitos e ficam na periferia da célula, mas que o reabastecimento desse íon

no momento da reinvasão reestabelece essa função no parasito; isso sugere que não há nenhuma mudança estrutural no merozoíto com a ausência de cálcio, mas que essa ausência inviabiliza alguma maquinaria de invasão. A localização da calmodulina na região apical do merozoíto, local por onde a invasão da hemácia se inicia, sugere uma causalidade entre as duas informações. Já existe uma pequena via descrita que corrobora essa hipótese: a proteína quinase B de *Plasmodium falciparum* (PfPKB), que foi demonstrada estar associada ao complexo motor responsável pelo processo de invasão da hemácia pelo merozoíto (*gliding*), é ativada por calmodulina³⁰.

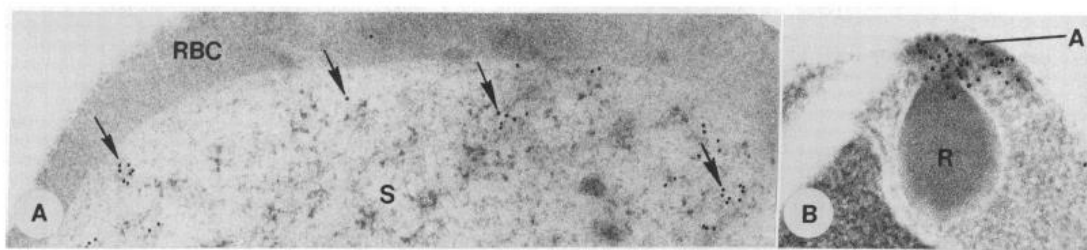


Figura 10. Localização da calmodulina no estágio esquizonte (lado esquerdo) e no merozoíto (lado direito), ambos apontados pelas setas. Retirado de Scheibel²⁷.

São poucas as evidências experimentais de interação entre a calmodulina e outras proteínas em *P. falciparum*. A principal evidência experimental vem de um grande *screening* do interatoma do parasito feito pelo experimento de duplo híbrido (Y2H)³¹. Existem também artigos que partem de estratégias bioinformáticas para se inferir interações em *P. falciparum*³²⁻³⁴. Em resumo, as interações preditas e experimentalmente descritas para PfCaM até o momento estão descritos na Tabela 2:

Tabela 2. Lista de proteínas preditas e experimentalmente descritas que interagem com PfCaM. As proteínas preditas vieram do *software* STRING, e as proteínas experimentalmente descritas são do ensaio de duplo híbrido performedo por LaCount *et al.*

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Proteína	Acesso UniProt	Acesso PlasmoDB	STRING	Y2H
Proteína <i>actin-like</i> ALP1, putativa	Q8IIQ4	PF3D7_1110700	x	–
Proteína quinase cálcio-dependente 6	Q8IID5	PF3D7_1122800	x	–
Proteína quinase cálcio-dependente 7	Q8IID2	PF3D7_1123100	x	–
Miosina K, putativa	Q8IHW0	PF3D7_1140500	x	–
Miosina E	C6KSY1	PF3D7_0613900	x	–
Ferredoxina NADP redutase (FNR ⁺)	C6KT68	PF3D7_0623200	x	–
Óxido nítrico sintase, putativa	C0H553	PF3D7_0923200	x	–
Actina-1	Q8I4X0	PF3D7_1246200	x	–
Calcineurina (PP2B)	Q8IAM8	PF3D7_0802800	x	x
Fator de transcrição AP2	Q8IIS4	PF3D7_1107800	–	x
Cadeia leve de miosina B (MLC-B)	Q8III1	PF3D7_1118700	–	x
Proteína putativa MAL8P1.18	Q8IBA8	PF3D7_0827600	–	x
Proteína não caracterizada	Q8ILR8	PF3D7_1417700	–	x
<i>Merozoite surface protein 1</i>	Q8I0U8	PF3D7_0930300	–	x
<i>Serine repeat antigen 5</i>	Q9TY95	PF3D7_0207600	–	x
Chaperona disulfide isomerase PDI8	C0H4Y6	PF3D7_0827900	–	x
Proteína não caracterizada	C0H5C8	PF3D7_1321100	–	x
Complexo FACT, subunidade SSRP1	Q8IL56	PF3D7_1441400	–	x

Fontes: STRING (<https://string-db.org>), PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>), UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot>) e LaCount *et al.*³¹

2 JUSTIFICATIVAS

A malária, apesar de ser uma protozoose descrita há mais de cem anos, caminha a passos lentos para sua erradicação. Existem medicamentos no mercado, e a terapia combinada à base de artemisina (ACT) tem mostrado resultados promissores; entretanto, já foram reportados casos de resistência à terapia ACT em alguns países⁶. Nesse cenário, utilizar estratégias rápidas e eficientes para a busca de novos fármacos para o tratamento da malária mostra-se algo promissor.

Apesar de existirem vários momentos importantes durante todo o ciclo de vida em *P. falciparum*, existe uma necessidade em se dar um foco maior no ciclo intraeritrocitário, pois a ruptura da hemácia é responsável pelas principais manifestações sintomáticas da doença (febre cíclica, calafrios, anemia aguda). De todas as formas presentes nessa etapa, estudar a esquizogonia aparece como uma estratégia interessante, tendo em vista que é o momento de multiplicação do parasito, que aumenta exponencialmente sua população para invadir novas células, e impedir esse momento também impediria a progressão da doença no hospedeiro.

A calmodulina é uma importante proteína eucariótica, que funciona como sinalizadora intracelular mediada por cálcio, e é responsável por modular várias proteínas sensíveis a mudanças de concentração desse íon. Entretanto, é uma proteína altamente conservada entre os eucariotos, e essa característica descarta a possibilidade de ela ser um alvo para medicamentos em *P. falciparum*. Busca-se, portanto, estudar as interações feitas por essa proteína essencial para o parasito e, dentre as parceiras da calmodulina, encontrar alguma que seja exclusiva do parasito; essa proteína seria uma potencial candidata para posteriores estudos de alvos para fármacos no agente causador da malária.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Combinar estratégias bioinformáticas e experimentais visando investigar as interações entre PfCaM e suas proteínas parceiras em esquizontes de *Plasmodium falciparum*, em busca de alvos para combate da malária.

Metas

- Usar estratégias bioinformáticas para estabelecer parceiros de PfCaM, com base no princípio de que interações que envolvem proteínas conservadas se estabeleçam durante o processo evolutivo;
- Estabelecer metodologia baseada em cromatografia de afinidade à calmodulina para melhor análise das interações entre essa proteína e seus ligantes durante a esquizogonia em *P. falciparum*;
- Estabelecer metodologia baseada em BN-PAGE para melhor análise das interações entre PfCaM e seus ligantes durante a esquizogonia em *P. falciparum*;
- Expressar heterologicamente PfCaM, visando posteriores estudos de interatoma;
- Analisar as interações realizadas pela calmodulina a partir da identificação de seus ligantes e inferir a relevância dessas interações durante o processo de esquizogonia e individualização dos merozoítos;
- Buscar, entre os ligantes de calmodulina em *P. falciparum*, proteína(s) exclusivas do parasito e analisar o potencial dessa(s) como possível(is) alvo(s) para fármacos contra a malária.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Abordagem *in silico*: investigação de possíveis parceiros da calmodulina por cross-species comparison:

4.1.1 Procura por espécie próxima filogeneticamente

Foram usadas para a inferência de parceiros da calmodulina somente espécies que possuíam suas interações proteína-proteína experimentalmente descritas e depositadas em banco de dados. Em cada uma das espécies que cumpriam esse requisito procurou-se a sequência da proteína correspondente ao gene da calmodulina na base de dados UniProt (<http://www.uniprot.org>) e, ao final, todas as sequências (incluída a de *P. falciparum*) foram submetidas à alinhamento e posterior construção de árvore filogenética pelo programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). A base de dados de interatoma do(s) organismo(s) mais próximos filogeneticamente foram usadas para inferir possíveis parceiros da calmodulina em *P. falciparum*.

4.1.2 Lista de possíveis parceiros da calmodulina em *Plasmodium falciparum*

As parceiras da calmodulina (CBPs, *Calmodulin-binding proteins* em inglês) nas espécies analisadas foram submetidas a alinhamento na plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra todas as proteínas de *P. falciparum* depositadas no banco de dados do NCBI (query: *Plasmodium falciparum*, isolate 3D7, taxid: 36329), com os parâmetros *default* do algoritmo de alinhamento. Foram levadas em consideração somente os alinhamentos com relevância estatística.

4.1.3 Análise das CBPs com ortólogos em *Plasmodium falciparum*

As parceiras de calmodulina com sequências ortólogas em *P. falciparum* foram analisadas com relação a evidências experimentais da sua existência. Posteriormente, as proteínas com evidência experimental foram analisadas com

relação ao seu possível papel na biologia do parasito e com a similaridade entre elas e as seqüências ortólogas em humanos.

O fluxograma de *Data mining* da abordagem bioinformática está exemplificado na Figura 11:

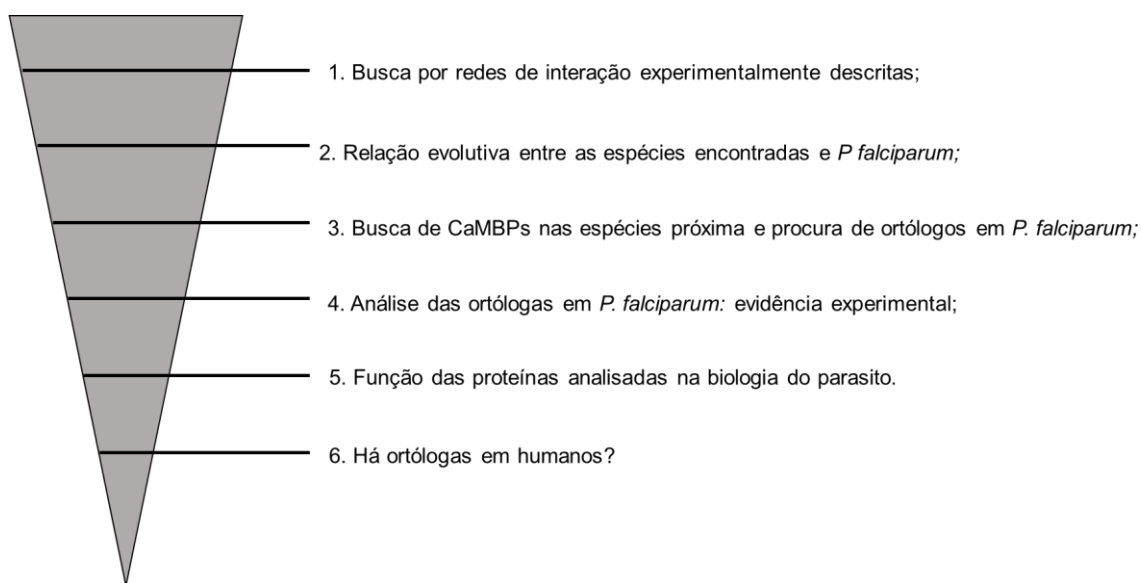


Figura 11. *Data mining* da abordagem bioinformática, mostrando todas as etapas até chegar na(s) possível(is) candidata(s) a estudos posteriores de interação com calmodulina em *P. falciparum*.

4.2 Abordagens experimentais: busca de parceiros de PfCaM

4.2.1 Microrganismos, hemocomponentes e manutenção da cultura de protozoários

Nesse trabalho foi utilizada a cepa 3D7 do parasito *Plasmodium falciparum*, não resistente à cloroquina. A cepa 3D7 foi cedida pelo Prof. Dr. Philippe Grellier, do *Muséum National d'Histoire Naturelle*, em Paris (França).

Os hemocomponentes usados nesse trabalho foram cedidos pela Fundação Hemocentro de Brasília: as hemácias foram alíquotadas e cada tubo foi lavado três vezes com meio RPMI para retirada de eventuais conservantes; o plasma sanguíneo foi incubado a 56°C por 1h para desativação do sistema complemento, posteriormente foi alíquotado, centrifugado a 4000G por 15

minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos de 50mL estéreis e congelados.

4.2.1.1 Cultura de parasitos

Isolados de *P. falciparum* cepa 3D7 foram mantidos em cultura contínua de eritrócitos humanos (A⁺ ou O⁺) em meio RPMI (Gibco®) e hematócrito final de 2% (v/v). Os parasitos foram incubados em estufa com temperatura constante de 37°C e atmosfera de 5% de dióxido de carbono. A parasitemia da cultura foi analisada diariamente por observação de esfregaços sanguíneos corados pelo método May-Grunwald-Giemsa; o meio foi trocado após cada análise.

O meio RPMI foi previamente suplementado com glicose 0,4% (w/v), bicarbonato de sódio 0,2% (w/v), HEPES 25mM, hipoxantina 0,0005% (w/v) e 8% (v/v) de soro humano de complementado (inativação do sistema complemento por calor). As culturas foram mantidas no Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

4.2.1.2 Sincronização do ciclo intraeritrocitário por sorbitol

A cultura de *P. falciparum* foi sincronizada para enriquecimento da forma esquizonte, já que todas as formas intraeritrocitárias coexistem durante uma cultura contínua comum: a cultura com parasitemia maior ou igual a 5% foi centrifugada a 600 x g por cinco minutos para separar as hemácias do meio de cultura e posteriormente essas hemácias foram ressuspensas em nove volumes de solução aquosa de sorbitol 5% (w/v) e incubadas a 37°C por 10 minutos, conforme protocolo estabelecido³⁵: solução foi homogeneizada três vezes durante o período de incubação. Após o período estabelecido, a cultura foi centrifugada a 600 x g por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e a cultura lavada três vezes com meio RPMI (600 x g por cinco minutos) para retirada de sorbitol remanescente. Após lavagem o hematócrito da cultura foi reajustado para 2% (v/v), foi acrescentado meio de cultura às hemácias e a incubação foi retomada.

O procedimento foi repetido após 48h, para garantir que existisse predominantemente uma das formas morfológicas intraeritrocitárias, que foi acompanhada por esfregaços sanguíneos até atingir a forma esquizonte, para ser posteriormente extraída.

4.2.1.3 Extração dos parasitos por lise eritrocitária seletiva

A composição diferente em colesterol das membranas do glóbulo vermelho, do parasito e da membrana do vacúolo parasitóforo permite a lise seletiva dos glóbulos vermelhos, mantendo os parasitos intactos por saponina. A saponina é um detergente que preferencialmente lisa membranas ricas em colesterol.

A cultura foi previamente centrifugada a 600 x g por cinco minutos, para retirada do meio de cultura remanescente. Os eritrócitos foram lavados com PBS (600 x g por cinco minutos) e incubados em gelo com 10 volumes de solução gelada de saponina 0,15% (v/v) em PBS, acrescida de inibidor de proteases, por cinco minutos. O sedimento parasitário foi obtido por centrifugação (10.000 x g, 10 minutos, 4°C); esse sedimento foi lavado ao menos três vezes para retirada de remanescentes de hemácias visíveis a olho nu.

Após lavagem o sedimento foi ressuspenso em 1mL de PBS acrescido de inibidor de proteases e novamente centrifugado. O sedimento resultante foi congelado.

4.2.2 Cromatografia de afinidade à calmodulina

4.2.2.1 Preparação da resina Sepharose 4B – CaM

Para o protocolo de cromatografia de afinidade à calmodulina a resina foi aliquoteada (1mL) em coluna e equilibrada com tampão HEPES 50mM, pH 7,5. Foi acrescentado 2mM de CaCl₂ no tampão para mudar a conformação da calmodulina fixada na coluna para a estrutura tridimensional “halteres”, descrita como a forma “ativa” da proteína.

4.2.2.2 Preparação da amostra

As amostras de parasito, após tratamento com saponina, foram homogeneizadas com tampão (HEPES 50mM, pH 7,5; glicerol 10% (v/v), inibidor de proteases). O homogenato foi centrifugado (16.000 x g/30minutos/4°C), o debris celular foi descartado e foi acrescentado CaCl₂ 2mM ao sobrenadante.

4.2.2.3 Lavagens e eluições

A amostra foi incubada com a resina Sepharose 4B-CaM no gelo por duas horas. A fração não-ligada foi recolhida por centrifugação (400 x g/4°C) e a resina foi lavada posteriormente com 10 mL de tampão de equilíbrio contendo NaCl 200mM, conforme protocolo estabelecido na literatura. A resina foi, então, montada numa coluna e as proteínas ligantes de calmodulina foram eluídas com dois tampões: 500µL de tampão de eluição 1 (HEPES 50mM, pH 7,4; 2mM de EGTA, 100mM de NaCl), para desmontar o formato “halteres” da calmodulina e assim desligar as proteínas associadas à PfCaM; e 500µL de tampão de eluição 2 (8M de uréia em HEPES 50mM, pH 7,4), para desligar as interações que não foram desfeitas com o acréscimo do EGTA no primeiro tampão.

4.2.3 Análise das frações por Espectrometria de Massas do tipo LC-MS/MS

4.2.3.1 Preparo da amostra

As amostras resultantes da cromatografia de afinidade foram liofilizadas e na amostra “seca” foi acrescentado o tampão: uréia 8M, NaCl 0,075M, TEAB 0,05M, pH final de 8,2. Posteriormente as amostras foram submetidas à redução das pontes dissulfeto com DTT (dithiothreitol) em concentração final de 0,005M; foram incubadas à temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, as cisteínas reduzidas foram alquiladas com IAA (iodoacetamida) em concentração final de 0,014M; e incubação por 40 minutos à temperatura ambiente. Para parar o processo de alquilação, foi acrescentado DTT em concentração final de 0,005M. A solução final foi diluída em TEAB 0,025M (pH 7,9) (bicarbonato de trietilamônio) na razão 1:5 e foi acrescentado CaCl₂ na concentração final de 0,001M. Por fim, foi acrescentada a enzima tripsina na razão 1:100 e a solução

resultante foi incubada à 37°C por 18h. Após a incubação, a amostra esfriou e foi acrescentado TFA (ácido trifluoracético) em concentração final de 0,5% para parar a digestão triptica.

A solução de peptídeos resultante desse processo foi dessalinizada: primeiramente a coluna (Stage Tips C18) foi empacotada e equilibrada - seis membranas de C-18 (EMPORE™ - 3M) foram acondicionadas em ponteiros de 200µL, foi acrescentado 100µL de metanol 100%, que passou pelas membranas e foi descartado, seguido do equilíbrio da coluna com 100µL de ácido fórmico 0,1% (v/v). As amostras foram carregadas na coluna duas vezes: carregou-se a primeira vez, coletou-se o não ligado e essa solução foi passada pela coluna uma segunda vez. A coluna foi lavada quatro vezes com 100µL de ácido fórmico 0,1% (v/v); a solução que passou pela coluna foi descartada. Por fim, a amostra foi eluída com 200µL de solução com acetonitrila em concentração final de 80% (v/v) e ácido fórmico em concentração final de 0,1% (v/v); o procedimento foi repetido duas vezes. O eluído foi, enfim, liofilizado.

4.2.3.2 Cromatografia e Espectrometria de Massas

Os peptídeos tripticos já dessalinizados foram analisadas em um sistema cromatográfico de colunas capilares (nano-UHPLC Dionex Ultimate 3000) acoplado *on-line* ao espectrômetro de massas híbrido ion trap-orbitrap, Orbitrap Elite™ (Thermo Scientific).

Nas etapas de cromatografia foi utilizado o sistema nanoLC, que aqui consistiu em duas colunas: uma coluna tipo *trap* e uma coluna analítica: a primeira para reter os peptídeos e retirar quaisquer outros contaminantes que não foram removidos nos eventos anteriores, e a segunda para de fato analisar os peptídeos, que foram eluídos em gradiente crescente dos solventes A e B, e injetados no espectrômetro. Ambas as cromatografias trabalharam com o solvente A, 0,1% de ácido fórmico em água (v/v), e com o solvente B, 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (v/v). As etapas cromatográficas foram:

- Coluna *trap*: características - 100 μm x 200 mm, partículas C18 ReprisilPur de 5 μm , poros de 120 Å (Dr.Maich), empacotadas no laboratório; fluxo de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ de 98% do solvente A e 2% do solvente B.
- Coluna analítica: características - 75 μm x 35 cm, partículas C18 Reprisil de 3 μm , poros de 120 Å (Dr. Maich), empacotadas no laboratório. Os peptídeos foram separados na coluna primeiramente por gradiente de 2-40% de solvente B em 170 minutos, de 40 a 85% entre 170-185 minutos, depois seguiu-se uma etapa isocrática de 85% até entre 185-190 minutos e por fim retornando para 2% de solvente B entre 190-210 minutos, para o reequilíbrio da coluna.

Na etapa de espectrometria de massas, os peptídeos foram analisados no espectrômetro de massas híbrido LTQ Velos Pro *Orbitrap Elite* (Thermo Scientific). A interface entre o sistema nanoLC e o aparelho foi feita de forma automatizada por meio do *software Xcalibur 2.2 SP 1.78* (Thermo Scientific). A fonte de ionização utilizada foi *Nanospray Flex ion Source* (Thermo Scientific), com voltagem de spray ajustada para 2,5 kV e temperatura do capilar de transferência de 275 °C. Os espectros de MS foram adquiridos no modo positivo em modo DDA (*Data Dependent Acquisition*, em inglês). O ciclo de DDA consistiu em um *survey scan* entre as faixas de 300-1800 m/z, sob resolução de 120.000 FWHM (*Full Width at Half-Maximum*) para m/z 400 e com valor alvo de controle de ganho automático de 1×10^6 íons para todos *scans* no FTMS e tempo máximo de preenchimento de 200ms. O *survey scan* foi seguido pela fragmentação MS/MS por CID (*Collision-induced dissociation*, em inglês) dos quinze íons precursores com cargas múltiplas mais abundantes no tempo analisado; íons com carga +1 foram excluídos para a fragmentação. A janela de isolamento para seleção do íon precursor monoisotópico foi de 2 Th Os espectros de MS/MS, foram adquiridos sob energia de colisão de 35% e valor alvo de íons igual a 1E04 no *íon trap linear* (limiar de seleção de íons: 1000 contagens). Foram aplicados parâmetro de ativação $q =$

0,25 e tempo de ativação de 30ms. Íons precursores anteriormente fragmentados foram excluídos de forma dinâmica por 90s.

4.2.3.3 Análise dos dados

Os arquivos .raw gerados pelo equipamento foram submetidos a análise de dados nos programas PEAKS Studios 7.0 e Proteome Discover (Thermo Scientific) e foram submetidos a busca contra o banco de dados de *Plasmodium falciparum* 3D7 (5372 sequências, UniProtKB) e contra um banco de dados *decoy*, que consiste em um banco fictício, mas com propriedades semelhantes às sequências dos peptídeos gerados pelo MS/MS³⁶; esse procedimento visa à diminuição de falsos positivos, possível artefato da técnica de MS/MS. Os parâmetros de busca utilizados foram: tripsina como enzima utilizada; instrumento *Orbi-trap*; tipo de fragmentação CID; correção do precursor apenas para massa; qualidade dos filtros de *scan* maior que 0,65; tolerância para o erro de massa do precursor monoisotópico de 10 ppm; erro de massa para os fragmentos de 0,5 Da; máximo de duas clivagens perdidas por peptídeo; uma clivagem não específica em um terminal do peptídeo; carbamidometilação dos resíduos de cisteína (alquilação com iodoacetamida) como modificação fixa; acetilação do N-terminal da proteína e oxidação da metionina como modificações variáveis; máximo de três modificações pós-traducionais por peptídeos. Foi habilitada o filtro FDR (*False Discovery Rate*, em inglês) menor que 1% e só foram consideradas proteínas com ao menos um peptídeo único.

4.2.4 Expressão heteróloga de proteínas recombinantes de *P. falciparum*

4.2.4.1 Obtenção dos plasmídeos de expressão

O plasmídeo com o gene referente à proteína Calmodulina (UniProt id: P62203), foi adquirido da empresa Thermo® (GeneArt™ Gene Synthesis, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). O vetor de expressão escolhido foi o pET100/D-TOPO®, cujo mapa está exemplificado abaixo:

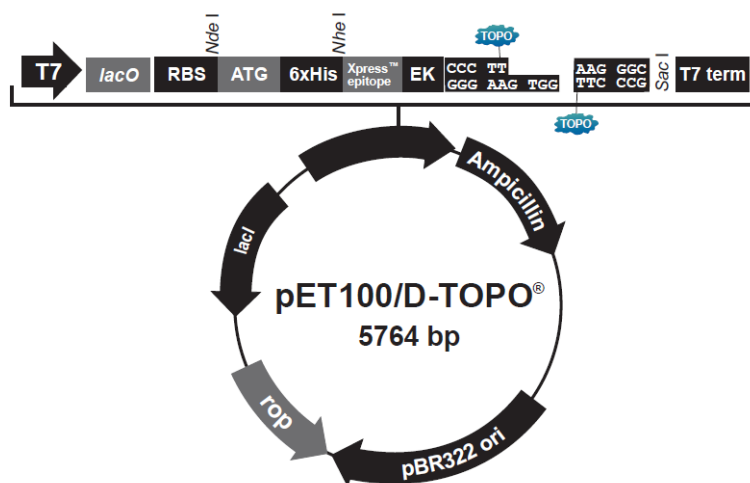


Figura 12. Mapa do vetor pET100/D-TOPO®, plasmídeo de expressão utilizado nesse estudo. Disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pet100dtopo_map.pdf

A construção final do plasmídeo está exemplificada na Figura 13:

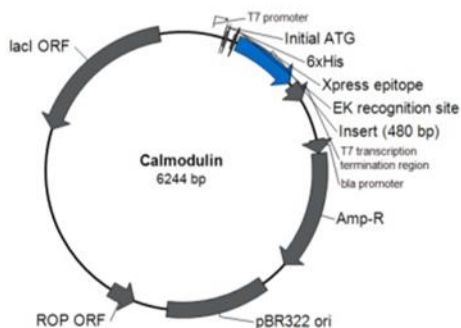


Figura 13. Construção do plasmídeo para expressão heteróloga de PfCaM em vetor pET TOPO® (Thermo®).

Além do acréscimo de seis histidinas na porção N-terminal da proteína recombinante, foi acrescentado na porção C-terminal da calmodulina uma cauda do tipo *c-myc*. Essa cauda foi inserida com o propósito de ser usada como ferramenta para posteriores ensaios de *pull down*. Foi feita a verificação de *códon usage* para garantir a expressão eficiente da proteína, e a sequência primária da proteína heteróloga foi checada com relação às enzimas de restrição passíveis de clivar a proteína expressa.

4.2.4.2 Transformação bacteriana

Bactérias *E. coli* da cepa BL21-AI™ (Invitrogen, by Life Technology) quimicamente competentes foram incubadas em gelo com 2µL dos plasmídeos de expressão por 30 minutos. Após a incubação, a transformação bacteriana aconteceu por choque térmico a 42°C por 45 segundos, seguida de outra incubação no gelo por cinco minutos. O homogenato resultante foi inoculado em 1mL de meio LB (Luria-Bertani) e foi incubado a 37°C por uma hora em agitação constante. Aproximadamente 100µL das colônias resultantes foram plaqueadas em meio LB-ágar acrescido de 100µg/mL de ampicilina e incubados à 37°C por 16h.

4.2.4.3 Indução da expressão de proteínas em bactérias transformadas

Uma colônia transformada foi retirada da placa com o auxílio de uma ponteira estéril e inoculada em meio LB acrescido de 100µg/mL de ampicilina. Esse pré-inóculo cresceu a 37°C overnight.

O pré-inóculo foi diluído em meio LB acrescido de 100µg/mL de ampicilina; o homogenato resultante foi incubado a 37°C em agitação constante. Ao atingir a densidade óptica entre 0,5 e 0,6 a 600nm, as culturas foram suplementadas com 1mM de IPTG e 20% (v/v) de L-arabinose e mantidas à temperatura escolhida para indução, em agitação. O tempo de indução variou para cada proteína. Após a incubação, a cultura foi centrifugada (1min, 12.000 x g), o sobrenadante foi descartado.

4.2.4.4 Purificação das proteínas recombinantes

4.2.4.4.1 Lise das bactérias

O pellet contendo as bactérias induzidas foi ressuspenso em 20mL de tampão Tris-HCl 50mM contendo NaCl 200mM e inibidor de proteases sem EDTA. A suspensão de bactérias foi lisada por sonicação (ciclo de 01m15s, pulse on: 02 seg, pulse off: 10 seg, amplitude de 40%). A solução resultante foi

centrifugada (10.000 x g, 10 minutos); o sobrenadante foi separado para posteriores análises.

Outra abordagem utilizada foi a lise de bactérias com o reagente BugBuster[®], (Millipore): o pellet foi incubado na proporção de 100µL de reagente para cada 500µg de sólido. A amostra foi solubilizada no reagente e incubada em temperatura ambiente por 20 minutos, em agitação constante. A solução foi, posteriormente, centrifugada (20.000 x g, 20 minutos), e o sobrenadante foi separado para posteriores análises.

4.2.4.5 Purificação de PfCaM por Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC)

A solução contendo a amostra processada conforme descrito na seção 4.2.4.4.1 foi utilizada para “carregar” uma resina de afinidade à níquel (Ni Sepharose[®] High Performance, GE HealthCare), previamente empacotada e previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM + NaCl 200mM. A amostra foi passada na coluna, a fração não-ligada foi recolhida e passada uma segunda vez. A segunda fração não-ligada foi recolhida e armazenada para posteriores análises.

A coluna, previamente carregada com a amostra, foi lavada com 5mL do tampão de equilíbrio, para retirar qualquer ligação inespecífica. As eluições foram feitas com 5mL de cada uma das soluções a seguir: tampão de equilíbrio acrescido de imidazol 10mM, tampão de equilíbrio acrescido de imidazol 60mM, tampão de equilíbrio acrescido de imidazol 100mM, tampão de equilíbrio acrescido de imidazol 200mM.

4.2.5 BN-PAGE

O gel do tipo *Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (BN-PAGE) foi utilizado para purificação e estudo de complexos proteicos solúveis de esquizontes de *P. falciparum*. As amostras foram obtidas a partir de cultura sincronizada do parasito, enriquecida na forma esquizonte, a partir do protocolo

de sincronização descrita no tópico 4.2.1.2. Para purificação de complexos solúveis, 1×10^7 células do parasita foram lisadas com solução BN-Lise buffer³⁷ e o material insolúvel foi separado por centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 minutos. Todas as amostras tiveram suas concentrações de proteínas determinadas por QUBIT (Thermo®). O gel *BN-PAGE* foi confeccionado contendo um gel separador com gradiente de 5 – 18% de concentração de acrilamida/bisacrilamida, e o gel concentrador, 4%. Após montagem do sistema e aplicação das amostras a corrida foi realizada a uma corrente constante de 15mA^{38,39}. Ao final da corrida o gel foi submetido a fixação e corado com CBB 250. Após a corrida, os géis foram lavados com solução de β -mercaptoetanol 1% (m/v) e SDS 1% (m/v), para desnaturar os complexos e transferi-los para a membrana de nitrocelulose.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Investigação de possíveis parceiros da calmodulina por cross-reference species

5.1.1 Screening inicial de potenciais domínios Pfam que interagem com CaM

A predição de interações entre proteínas pode ser baseada em diversos fatores, como conservação de uma interação importante para a fisiologia do organismo entre espécies. Observa-se, também, que há uma conservação entre a interação entre dois domínios, ou seja, é esperado que dois domínios Pfam apareçam interagindo em diferentes proteínas. Inclusive, foi demonstrado que mais de 50% dos domínios Pfam depositados no PDB até o ano de 2013 eram considerados monogâmicos, interagem sempre com o mesmo domínio ⁴⁰.

Baseado nessas premissas, foi feito um *screening* inicial dos domínios Pfam que interagem com o domínio *EF-hand*, que compõe a estrutura tridimensional da calmodulina. Para tal, foi usado o *software* KBDOCK ⁴¹: o programa alinha sequências primárias de domínios Pfam e combina esses dados com coordenadas do PDB, visando classificar diversas DDIs (*domain-domain interactions*) pelo seu acesso Pfam ⁴¹.

Usando a sequência primária de PfCaM como *query*, foram analisados os principais motivos Pfam associados com o motivo EF-hand 7, que compõe a estrutura tridimensional de PfCaM. Os resultados estão detalhados na Tabela 3:

Tabela 3. Famílias Pfam registradas no PDB que interagem com o domínio *EF-hand*, estrutura tridimensional que compõe a calmodulina. Análise feita pelo software *KBDOCK*

Acesso Pfam	Família Pfam
PF03520	KCNQ voltage-gated potassium channel
PF02736	Myosin N-terminal SH3-like domain
PF00063	Myosin head (motor domain)
PF13646	HEAT repeats
PF11601	Shal-type voltage-gated potassium channels, N-terminal
PF08763	Voltage gated calcium channel IQ domain
PF02888	Calmodulin binding domain
PF01387	Synuclein
PF02063	MARCKS family
PF00036	EF hand - 1
PF00069	Protein kinase domain
PF16905	Voltage-dependent L-type calcium channel, IQ-associated
PF00167	Fibroblast growth factor
PF03388	Legume-like lectin family
PF12515	Ca ²⁺ -ATPase N terminal autoinhibitory domain
PF00254	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
PF00307	Calponin homology (CH) domain
PF13405	EF-hand_6
PF03822	NAF domain
PF13499	EF-hand_7
PF14752	Retinol binding protein receptor
PF00992	Troponin
PF10163	Transcription factor e(y)2
PF12209	Leucine permease transcriptional regulator helical domain
PF12424	Plasma membrane calcium transporter ATPase C terminal
PF08457	Sfi1 spindle body protein
PF00540	gag gene protein p17 (matrix protein)
PF16644	Regulatory region of Na ⁺ /H ⁺ exchanger NHE binds to calmodulin
PF07686	Immunoglobulin V-set domain
PF00230	Major intrinsic protein
PF00149	Calcineurin-like phosphoesterase

Fonte: *software* KBDOCK (<https://kbdock.loria.fr/>).

É esperado, então, que as proteínas que interagem com CaM em *P. falciparum* tenham em suas estruturas tridimensionais algum dos domínios acima, tendo em vista que a maioria das *DDIs* são descritas como monogâmicas. Ademais, é possível usar essa informação como um filtro, de modo que potenciais proteínas que possam interagir com PfCaM possam ser, também, verificadas com relação aos seus domínios Pfam, o que daria mais um parâmetro

para elencar potenciais parceiros da proteína. Isso é interessante, tendo em vista que não existem peptídeos consenso específicos que determinem a interação entre CaM e seus parceiros, e sim aspectos bioquímicos e biofísicos compartilhados entre as *CaMBPs*.

Esse parâmetro será utilizado posteriormente como um filtro para refinar a busca de parceiros de PfCaM baseada na interação de CaM em outras espécies próximas de *P. falciparum*. Tendo em vista que CaM é uma proteína altamente conservada entre os vertebrados ⁴², é esperado que as interações realizadas por ela também possam ser conservadas, por se tratarem de vias centrais para a manutenção de processos essenciais dos diversos organismos.

5.1.2 Procura por espécies filogeneticamente relacionadas

Baseado na hipótese descrita acima, a estratégia usada para elencar os candidatos para posteriores análises de parceiros e calmodulina em *Plasmodium falciparum* foi buscar em bancos de dados os organismos com suas redes de interação proteína-proteína – interatoma - descritas experimentalmente. Essa busca resultou em 28 organismos: nove eucariotos, 10 vírus e nove procaríotos (Tabela 4).

Tabela 4. Relação das espécies encontradas com interatomos experimentalmente descritos e seus respectivos bancos de dados de interação. As espécies que estão sem banco de dados relacionados têm um interatoma muito pequeno e as proteínas foram relacionadas nos artigos que descreviam as interações.

Espécie	Banco de dados do interatoma
EUKARYOTA	
<i>Homo sapiens</i>	http://interactome.dfci.harvard.edu/H_sapiens/host.php
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	http://www.yeastkinome.org/index.php
<i>Arabidopsis thaliana</i>	http://interactome.dfci.harvard.edu/A_thaliana/index.php
<i>Oryza sativa</i>	–
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	http://www.pombase.org/
<i>Caenorhabditis elegans</i>	http://interactome.dfci.harvard.edu/C_elegans/index.php
<i>Drosophila melanogaster</i>	http://www.droidb.org/
<i>Mus musculus</i>	http://gsun.grc.nia.nih.gov/mppi/
<i>Plasmodium falciparum</i>	http://www.plasmodb.org/plasmo/
VIRUS	
<i>Mycobacteriophage Giles</i>	–
<i>Bacteriophage lambda</i>	–
<i>Streptococcus pneumoniae Dp-1 phage</i>	–
<i>Varicella zoster virus (VZV)</i>	http://www.ebi.ac.uk/intact/pages/interactions/interactions.xhtml?query=IM-11718
Hepatitis C virus	–
Herpes virus	–
Kaposi's sarcoma-associated virus	–
murine cytomegalovirus	–
Epstein-Barr virus	–
Chadipura virus	–
BACTERIA	
<i>Helicobacter pylori</i>	http://www.nature.com/nature/journal/v409/n6817/supinfo/409211a0.html
<i>Campylobacter jejuni</i>	http://proteome.wayne.edu/CampyDescription.html
<i>Treponema pallidum</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2386257/#pone.0002292.s001
<i>Escherichia coli</i>	http://www.compsysbio.org/bacteriome/index.php
<i>Mesorhizobium loti</i>	http://genome.microbedb.jp/rhizobase/Mesorhizobium
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	–
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	–
<i>Synechocystis</i> sp.	http://ppi.kazusa.or.jp/Synechocystis/
<i>Staphylococcus aureus</i>	–

Fonte: As fontes dos diversos bancos de dados estão listadas na coluna “Banco de dados do Interatoma”.

O motivo de serem usados somente redes de interação descritas experimentalmente se deu pelo fato de que muitos interatomos depositados em bancos de dados são somente preditos por ferramentas bioinformáticas. Isso quer dizer que não necessariamente há a confirmação experimental de que a proteína A e a proteína B, descritas nessa rede como parceiras, de fato estejam juntas em uma via metabólica. Isso poderia inserir falsos positivos nas análises posteriores. Para evitar esse problema, somente foram levadas em consideração as interações experimentalmente descritas. Vale ressaltar que *P. falciparum* possui algumas abordagens *in silico* publicadas para predição de redes de

interação, boa parte baseada em dados de genômica. Algumas delas têm como objetivo a predição de funções para proteínas que estão depositadas no banco de dados do organismo como *hypothetical protein* ou *uncharacterized protein* 32,33.

Como a calmodulina é uma proteína eucariótica, os organismos procarióticos e os vírus foram desconsiderados e as análises seguintes foram feitas com os nove organismos eucarióticos listados.

Para a escolha do melhor banco de dados de interação de onde seriam inferidas as interações de PfCaM, foi feita uma análise entre as sequências primárias das calmodulinas dos nove organismos eucariotos listados e a sequência primária de PfCaM. Com as conservações e divergências entre as sequências, foi possível estabelecer a relação evolutiva entre esses organismos. Essa relação é demonstrada no dendograma da Figura 14.

Conforme observado na Figura 14, as espécies mais próximas de *P. falciparum* no filograma foram *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Ambas as espécies possuem seus mapas de interação depositados em plataformas específicas, que foram detalhadas na Tabela 4. Nessas plataformas, *gene ID* de cada espécie é usado como *query* para procurar na plataforma todas as proteínas que tenham evidências de interação com aquele gene.

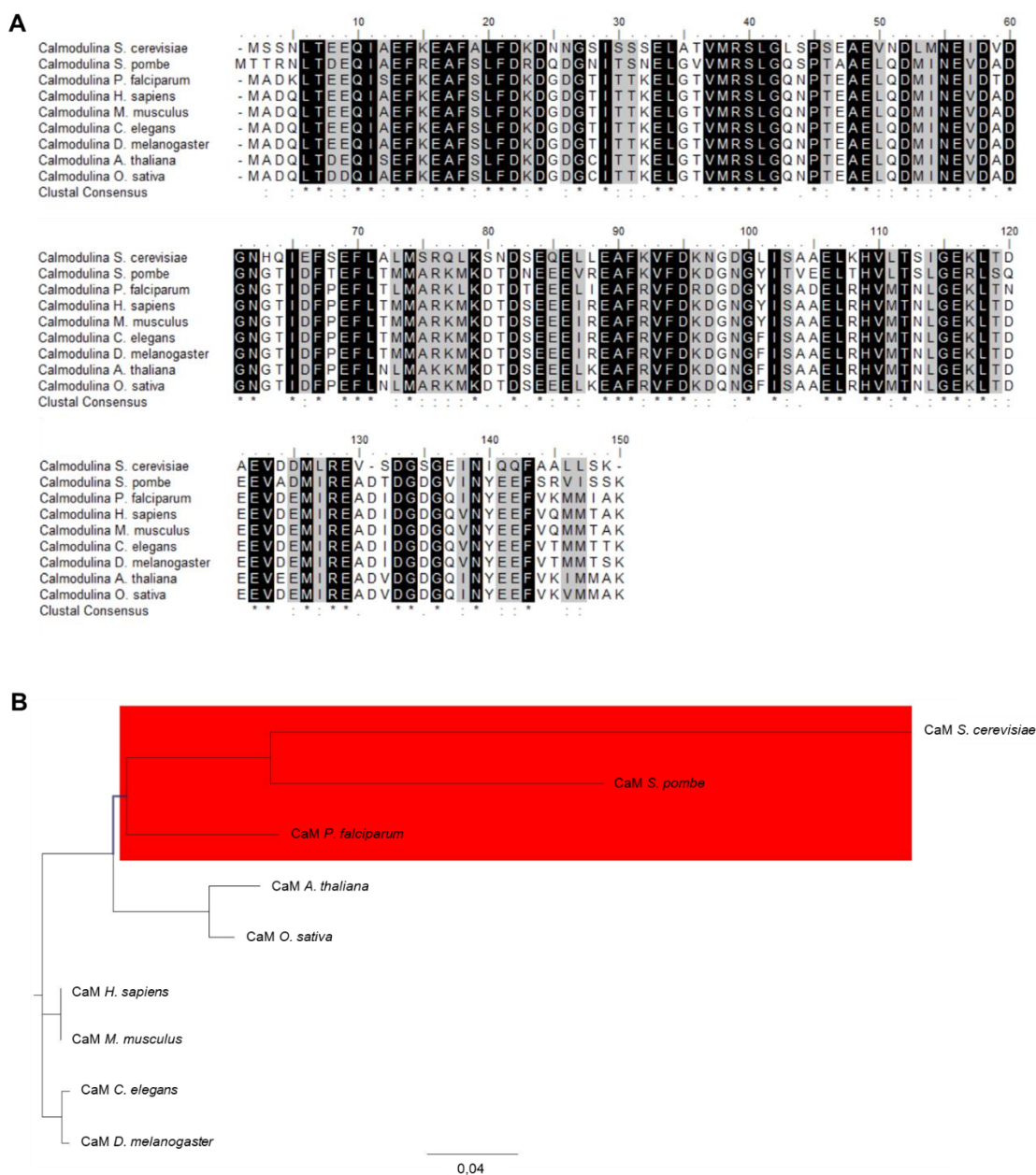


Figura 14. Análise da relação evolutiva entre as espécies elencadas para análise de interatoma e PfCaM. (A) Alinhamento entre as sequências primárias de PfCaM e das calmodulina das espécies candidatas à análise de *cross reference species*. O alinhamento foi realizado no *software* Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). (B) Filograma baseado no alinhamento demonstrado em A. A escala embaixo está relacionada com o *score* de cada um dos ramos. Os dados para o filograma foram gerados pelo Clustaw Omega, e a parte gráfica foi feita usando o *software* FigTree (disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

Assim sendo, o *gene ID* da calmodulina de cada espécie foi usado como *query* para buscar na plataforma todas as proteínas descritas que interagissem com ela nas espécies analisadas. A lista final gerada levou em consideração apenas interações experimentalmente descritas, tendo em vista que ambas as plataformas continham interações previstas tanto experimentalmente quanto preditas por métodos bioinformáticos. Os números finais foram:

- 56 possíveis parceiros de calmodulina em *S. cerevisiae*;
- 07 possíveis parceiros em *S. pombe*.

5.1.3 Investigação de possíveis parceiros da calmodulina em *P. falciparum*

A análise de similaridade de sequência parte do pressuposto de que proteínas que compartilham similaridades em suas sequências primárias também compartilham a mesma função ³². Da mesma forma, espera-se que interações relacionadas a vias essenciais à sobrevivência do organismo também sejam mantidas pelos organismos através da evolução das espécies.

Partindo desse pressuposto, as proteínas que interagem com CaM nos organismos mais próximos evolutivamente foram elencadas para posteriores análises. As sequências dessas proteínas foram confrontadas contra o banco de dados de *P. falciparum*, e a lista de proteínas ortólogas foram listadas. Foram levadas em consideração para posteriores análises somente proteínas com *score* >200, conforme parâmetros do programa.

Entre as parceiras de calmodulina de *S. cerevisiae*, 41% (23/56) não tiveram ortólogas em *P. falciparum* com relevância estatística, e 30% das proteínas ortólogas encontradas estão depositadas no banco de dados como *hypothetical protein* ou *uncharacterized protein*. Entre as proteínas de *S. pombe* o número de ortólogos em *P. falciparum* sem significância estatística foi maior, 57% (4/7); mas o número era esperado, já que a rede de interação envolvendo a calmodulina nessa espécie é pequena. Os dados de ambas as espécies estão organizados nas Tabelas 5 e 6:

Tabela 5. Parceiras da calmodulina descritas experimentalmente em *S. cerevisiae* que possuem correspondentes ortólogos em *P. falciparum*. A significância estatística, bem como os percentuais de identidade, positivos e *gaps* foram calculados por algoritmos da plataforma BLAST.

Parceiro de CaM em <i>S. cerevisiae</i>	Acesso UniProt	Ortólogo em <i>P. falciparum</i>	Acesso UniProt	Score BLAST	Identidade	Positivos	Gaps
60S ribosomal protein L26-B	P53221	60S ribosomal protein L26, putativa	O77364	131	61/117(52%)	88/117(75%)	0/117(0%)
Actin-regulating kinase PRK1	P40494	Cyclin g-associated kinase, putativa	Q8I4V7	148	84/286(29%)	155/286(54%)	15/286(5%)
		NIMA-related proteina kinase, Pfnek-1	Q8I5D5	84,3	66/247(27%)	123/247(49%)	37/247(14%)
Actin-related protein 3	P47117	Actin II	Q8ILW9	262	153/439(35%)	233/439(53%)	78/439(17%)
		Actin I	Q8I4X0	251	148/439(34%)	233/439(53%)	79/439(17%)
		Actin-related protein, ARP1	Q8I2A2	226	145/446(33%)	225/446(50%)	78/446(17%)
Cálcio/calmodulina-dependente proteína kinase I	P27466	Calcium-dependent protein kinase 2	Q8ICR0	205	112/265(42%)	161/265(60%)	10/265(3%)
Cálcio/calmodulina-dependente proteína kinase II	P22517	Calcium-dependent protein kinase 2	Q8ICR0	208	131/340(39%)	191/340(56%)	22/340(6%)
Caseína kinase II, subunidade alfa	P19454	Casein kinase II, subunidade alfa	Q8IIR9	363	194/331(59%)	249/331(75%)	6/331(1%)
Caseína kinase II, subunidade beta	P38930	Casein kinase II, cadeia beta	Q8IIW5	133	81/221(37%)	109/221(49%)	14/221(6%)
DNA-directed RNA polimerase II subunidadeRPB3	P16370	DNA-directed RNA polymerase II, putativa	Q8I2S6	125	69/186(37%)	103/186(55%)	7/186(3%)
		DNA-directed RNA polymerase I, putativa	Q8IHT3	108	78/273(29%)	135/273(49%)	41/273(15%)
Hsp SSB2	P40150	Hsp70-x	K7NTP5	688	346/581(60%)	435/581(74%)	5/581(0%)
		Hsp70	Q8IB24	674	342/562(61%)	425/562(75%)	5/562(0%)
		Hsp70, homóloga	Q8I2X4	616	307/574(53%)	420/574(73%)	9/574(1%)
		Hsp70, homóloga	Q8II24	516	276/557(50%)	370/557(66%)	21/557(3%)
Pirofosfatase inorgânica	P00817	Pirofosfatase inorgânica MAL3P6.3	O77392	148	90/207(43%)	118/207(57%)	17/207(8%)
		Pirofosfatase inorgânica MAL3P6.3	O77392	149	90/210(43%)	119/210(56%)	17/210(8%)
Mitosis inhibitor proteína kinase SWE1	P32944	Serine/treonina-proteina kinase Nek-2	C0H4G2	84,3	60/206(29%)	110/206(53%)	17/206(8%)
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	P14832	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Q76NN7	219	100/167(60%)	124/167(74%)	6/167(3%)
Proteassoma, subunidade alfa, tipo-5	P32379	Proteassoma, subunidade alfa	Q8IBI3	247	127/262(48%)	178/262(67%)	178/262(67%)
Pyrraline-5-carboxylate redutase	P32263	Pyrraline-5-carboxylate redutase	Q8IDC6	132	87/283(31%)	137/283(48%)	29/283(10%)

(Continua)

Fontes: Yeast Kinome (<https://yeastkinome.org/index.php>), BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot>).

Tabela 5. Parceiras da calmodulina descritas experimentalmente em *S. cerevisiae* que possuem correspondentes ortólogos em *P. falciparum*. A significância estatística, bem como os percentuais de identidade, positivos e *gaps* foram calculados por algoritmos da plataforma BLAST.

(Continuação)

Parceiro de CaM em <i>S. cerevisiae</i>	Acesso UniProt	Ortólogo em <i>P. falciparum</i>	Acesso UniProt	Score BLAST	Identidade	Positivos	Gaps
MPS1 - serina/treonina-proteína quinase MPS1	P54199	<i>NIMA related</i> kinase 4	C0H4N8	94,7	89/337(26%)	149/337(44%)	50/337(14%)
		Cálcio-dependente proteína quinase 2	Q8ICR0	93,2	81/280(29%)	133/280(47%)	36/280(12%)
		<i>NIMA related</i> kinase 2	C0H4G2	90,1	76/288(26%)	135/288(46%)	39/288(13%)
		Cálcio/calmodulina-dependente proteína quinase 2	Q8ICR0	92,4	81/280 (29%)	133/280 (47%)	36/280 (12%)
		<i>Cdc2-related protein</i> kinase 1	Q81Q9	84,7	72/252(29%)	115/252(45%)	36/252(14%)
		Cálcio-dependente proteína quinase 1	P62344	84	81/300(27%)	131/300(43%)	47/300(15%)
		<i>cGMP-dependent</i> proteína quinase	Q8I719	83,6	53/167(32%)	83/167(49%)	30/167(17%)
<i>MutS protein homolog</i> 4	P40965	<i>DNA mismatch repair protein MSH2</i> , putativa	Q8ILI9	162	165/702(24%)	319/702(45%)	60/702(8%)
		<i>DNA mismatch repair protein MSH2</i> , putativa	C0H4L8	137	72/220(33%)	127/220(57%)	10/220(4%)
		<i>DNA mismatch repair protein MSH6</i> , putativa	Q8I447	94	83/309(27%)	146/309(47%)	26/309(8%)
Cadeia leve de miosina 1	P53141	Calmodulina	P62203	96,3	52/136(38%)	87/136(63%)	6/136(4%)
Miosina 2	P19524	Miosina A	Q8IDR3	350	237/764(31%)	398/764(52%)	58/764(7%)
		Miosina B	Q8I465	304	224/706(32%)	380/706(53%)	71/706(10%)
		Miosina C	Q8IE50	231	151/420(36%)	230/420(54%)	33/420(7%)
Miosina-3	P36006	Miosina A	Q8IDR3	363	227/731(31%)	403/731(55%)	29/731(3%)
		Miosina B	Q8I465	276	206/700(29%)	363/700(51%)	50/700(7%)
		Miosina C	Q8IE50	223	135/404(33%)	218/404(53%)	31/404(7%)
Miosina-4	P32492	Miosina A	Q8IDR3	380	251/764(33%)	412/764(53%)	61/764(7%)
		Miosina B	Q8I465	301	205/647(32%)	347/647(53%)	51/647(7%)
		Miosina C	Q8IE50	239	154/415(37%)	229/415(55%)	34/415(8%)
Miosina-5	Q04439	Miosina A	Q8IDR3	362	219/735(30%)	403/735(54%)	45/735(6%)
		Miosina B	Q8I465	286	212/706(30%)	366/706(51%)	47/706(6%)
		Miosina C	Q8IE50	223	135/401(34%)	216/401(53%)	25/401(6%)

Fontes: Yeast Kinome (<https://yeastkinome.org/index.php>), BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot>).

Tabela 5. Parceiras da calmodulina descritas experimentalmente em *S. cerevisiae* que possuem correspondentes ortólogos em *P. falciparum*. A significância estatística, bem como os percentuais de identidade, positivos e *gaps* foram calculados por algoritmos da plataforma BLAST.

(Conclusão)

Parceiro de CaM em <i>S. cerevisiae</i>	Acesso UniProt	Ortólogo em <i>P. falciparum</i>	Acesso UniProt	Score BLAST	Identidade	Positivos	Gaps
<i>t RNA pseudouridine (27/28) sintase</i>	P53167	<i>U2 snRNA/tRNA pseudouridine sintase</i> , putativa	C0H4R3	100	79/275(29%)	116/275(42%)	43/275(15%)
Fator de transcrição HAP5	Q02516	<i>CCAAT-binding transcription factor</i> , putativa	Q8IL74	100	50/107(47%)	72/107(67%)	9/107(8%)
Serina/treonina-proteína fosfatase 2B, subunidade catalítica A1	P23287	Serina/treonina fosfatase	Q8IAM8	405	185/345(54%)	248/345(71%)	6/345(1%)
		Serina/treonina fosfatase PP1	Q8ILV1	216	112/279(40%)	165/279(59%)	21/279(7%)
		Serina/treonina fosfatase	Q8I2Q4	211	106/264(40%)	161/264(60%)	18/264(6%)
Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit A2	P14747	Serina/treonina fosfatase	Q8IAM8	408	194/389(50%)	268/389(68%)	27/389(6%)
		Serina/treonina fosfatase PP1	Q8ILV1	209	106/292(36%)	170/292(58%)	38/292(13%)
<i>Signal recognition particle receptor</i> , subunidade alfa	P32916	<i>Signal recognition particle receptor</i> , subunidade alfa	Q8ID42	218	132/327(40%)	186/327(56%)	41/327(12%)
Tubulina, cadeia gama	P53378	Tubulina, cadeia gama	Q8IAN7	332	173/459(38%)	279/459(60%)	15/459(3%)
Tirosina-proteína fosfatase MSG5	P38590	Proteína fosfatase, putativa	Q8IKS8	50,1	23/66(35%)	43/66(65%)	1/66(1%)
Ubiquitin carboxyl-terminal hidrolase RPN11	P43588	<i>26S proteasome regulatory subunit RPN11</i> , putativa	Q8ID28	342	161/282(57%)	206/282(73%)	0/282(0%)

Fontes: Yeast Kinome (<https://yeastkinome.org/index.php>), BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot>).

Tabela 6. Parceiras da calmodulina descritas experimentalmente em *S. pombe* que possuem correspondentes ortólogos em *P. falciparum*. A significância estatística, bem como os percentuais de identidade, positivos e *gaps* foram calculados por algoritmos da plataforma BLAST.

Parceiro de CaM em <i>S. pombe</i>	Acesso Uniprot	Ortólogo em <i>P. falciparum</i>	Acesso Uniprot	Score BLAST	Identidade	Positivos	Gaps
Miosina 1	Q9Y7Z8	Miosina A	Q8IDR3	329	214/701(31%)	368/701(52%)	25/701(3%)
		Miosina B	Q8I465	291	215/678(32%)	364/678(53%)	45/678(6%)
		Miosina C	Q8IE50	215	137/419(33%)	221/419(52%)	24/419(5%)
Miosina 52	O94477	Miosina A	Q8IDR3	372	252/789(32%)	412/789(52%)	66/789(8%)
		Miosina B	Q8I465	323	221/691(32%)	369/691(53%)	45/691(6%)
		Miosina C	Q8IE50	234	157/427(37%)	234/427(54%)	24/427(5%)
Serina/treonina-proteína kinase nak1	O75011	NIMA related kinase 4	C0H4N8	132	88/274(32%)	143/274(52%)	12/274(4%)

Fontes: PomBase (<https://www.pombase.org>), BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot>).

Quando o genoma de *P. falciparum* foi publicado, aproximadamente 60% das proteínas preditas (3.208 proteínas em 5.268) não possuíam similaridade com outras proteínas de outros organismos, o que dificultou a predição de suas funções²⁴. Essa proporção de proteínas únicas em um organismo é considerada alta se comparada à proporção em outros eucariotos com o genoma sequenciado. Uma das justificativas desse número elevado é a grande proporção de (A+T) no genoma do parasito, o que reduz a proporção de similaridade de sequência das proteínas do organismo quando comparadas com outros eucariotos; outro fato é a distância evolutiva entre *P. falciparum* e outros organismos com o genoma sequenciado^{24,43}, fato evidenciado no filograma da Figura 13. Essa pode, também, ser uma justificativa para a baixa cobertura das proteínas ortólogas de *P. falciparum* em *S. cerevisiae* e *S. pombe*.

Outra estratégia utilizada para predição da função dessas proteínas únicas do parasito são as análises de interatoma. As proteínas do organismo são agrupadas com base em diferentes categorizações, como classificação no *Gene Ontology*, similaridade nas sequências primárias com outras proteínas descritas (ou buscas de domínios específicos), perfil temporal de expressão, classificação no KEGG ou acesso no *Enzyme Commission*, ensaios de duplo híbrido (ou outras formas de demonstrar PPIs) dentre outras. Todas essas classificações visam tecer redes de interação que contemplem essas proteínas não caracterizadas e, a partir desses dados, inferir a função dessas proteínas dentro do metabolismo do parasito (revisado em⁴³).

Tendo em vista esses fatos, todas as proteínas foram analisadas com relação à fonte de sua evidência. Foram levadas em consideração somente as proteínas ortólogas de *P. falciparum* com *score* a partir de 200. Como muitas das proteínas do parasito tiveram suas funções inferidas por homologia, esse refinamento dos dados evita que posteriores análises sejam feitas com proteínas sem evidência experimental. O resultado está listado na Tabela 7:

Tabela 7. Classificação das proteínas encontradas em *P. falciparum* na análise de *cross-reference species* com relação à sua evidência experimental no parasito. As proteínas em negrito foram as apontadas pelo UniProt com evidência a nível de mRNA ou nível proteico.

Proteína ortóloga em <i>P. falciparum</i>	Acesso Uniprot	Score no BLAST	Evidência Experimental
Actina II	Q8ILW9	262	Inferida por homologia
Actina I	Q8I4X0	251	Nível de proteína
Actin-related protein, ARP1	Q8I2A2	226	Inferida por homologia
Calcium-dependent protein kinase 2	Q8ICR0	205	Nível de mRNA
Casein kinase II, subunidade alfa	Q8IIR9	363	Nível de proteína
Hsp70-x	K7NTP5	688	Nível de mRNA
Hsp70	Q8IB24	674	Inferida por homologia
Hsp70, homóloga	Q8I2X4	616	Inferida por homologia
Hsp70, homóloga	Q8II24	516	Inferida por homologia
Miosina A	Q8IDR3	350	Nível de proteína
Miosina B	Q8I465	304	Inferida por homologia
Miosina C	Q8IE50	231	Inferida por homologia
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	Q76NN7	219	Inferida por homologia
Proteassoma, subunidade alfa	Q8IBI3	247	Nível de proteína
Serina/treonina fosfatase	Q8IAM8	405	Inferida por homologia
Serina/treonina fosfatase PP1	Q8ILV1	216	Inferida por homologia
Serina/treonina fosfatase	Q8I2Q4	211	Inferida por homologia
<i>Signal recognition particle receptor</i> , subunidade alfa	Q8ID42	218	Proteína predita
Tubulina, cadeia gama	Q8IAN7	332	Inferida por homologia
<i>26S proteasome regulatory subunit RPN11</i> , putativa	Q8ID28	342	Proteína predita

Fontes: BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot>).

Os critérios apresentados na Tabela 7 são os utilizados pelo UniProt para classificar as proteínas depositadas em seu banco de dados (disponível em http://www.uniprot.org/help/protein_existence). Basicamente:

- As proteínas anotadas como **evidência a nível proteico** representam aquelas que possuem evidência clara de sua existência, como sequenciamento de Edman, identificação clara por MS, raio X ou NMR, detecção dessa por anticorpos ou dados experimentais de PPIs;
- As proteínas anotadas como **evidência a nível de transcrito** (ou de mRNA) representam aquelas em que não há evidência direta da existência da proteína, mas há evidência clara da transcrição do gene relacionado;

- As proteínas anotadas como **inferidas por homologia** não possuem evidências diretas descritas, mas sua existência no organismo é muito provável, tendo em vista que existem proteínas ortólogas em organismos filogeneticamente próximos já descritas experimentalmente;
- As proteínas anotadas como **proteína predita** são aquelas que não possuem nenhuma das evidências descritas acima.

Vale ressaltar, entretanto, que algumas proteínas depositadas no banco de dados do UniProt como inferidas por homologia ou como proteínas preditas podem ter dados atualizados na literatura com relação a sua evidência experimental, e esses não terem sido atualizados na plataforma. Ou então, embora ainda não tenham sido descritas experimentalmente, as evidências indiretas de sua existência são relevantes o suficiente para se inferir que há a proteína no organismo, além da mera inferência por homologia. Esse é o caso de algumas das proteínas elencadas na Tabela 7.

A proteína ARP-1 (acesso UniProt Q8I2A2) já foi descrita em *P. berguei*, espécie que infecta roedores⁴⁴, embora tenha sido predita por homologia em outras espécies que não do gênero *Plasmodium*, como componente dos complexos dinactina-dineína⁴⁵. Esses fatos reforçam a hipótese de que a proteína de fato existe e é expressa em *P. falciparum*.

O transcrito da actina II (acesso UniProt Q8ILW9) já foi descrito por Wesseling e colaboradores⁴⁶, e tem um papel distinto na gametogênese masculina no parasito⁴⁷. Embora a actina II não seja essencial para a sobrevivência do parasito como é a actina I, parasitos $\Delta act2$ são incapazes de iniciar a gametogênese masculina graças ao bloqueio do processo de exflagelação, mostrando que a actina 1 é incapaz de substituir a actina 2 nesse processo⁴⁷.

A miosina B (acesso UniProt Q8I465) já possui evidência a nível proteico, e sabe-se que ela é expressa em todos os estágios do parasito, e é encontrada

em localização apical nos merozoítos, esporozoítos e oocinetos ⁴⁸. Essa proteína não está envolvida no complexo motor relacionado ao *gliding* do parasito, e suas funções específicas ainda carecem de detalhamento, embora seu posicionamento e presença nos estágios infectivos do parasito sugiram um papel importante na invasão ⁴⁸. Associada a ela, foi descrita uma *myosin light chain B*, que interage na região C-terminal da proteína, e parece funcionar como uma “cauda” que garante o bom funcionamento da função motora da miosina⁴⁸.

P. falciparum possui seis miosinas descritas no seu genoma, todas elas analisadas com relação ao seu perfil de transcrição no estágio intraeritrocitário ⁴⁹. Os transcritos relacionados à miosina C foram encontrados amplificados em trofozoítos, e foram preditos cinco motivos IQ na sequência primária da miosina C ⁴⁹, o que sugere fortemente a interação dessa proteína com a calmodulina. A sequência referente à miosina C está depositada como miosina F no PlasmoDB. Isso se deu graças a uma análise filogenética feita entre as miosinas das principais espécies em Apicomplexa, visando normatizar proteínas ortólogas, mas com nomenclaturas diferentes nos organismos filogeneticamente aproximados – com essa análise, a miosina C passou a ser nomeada como miosina F ⁵⁰. Em *Toxoplasma gondii*, miosina F é relacionada com o correto posicionamento das células-filhas durante a divisão celular, e parasitos $\Delta myoF$ tem o *turnover* do apicoplasto bem prejudicado, levando à morte do parasito ⁵¹.

A serina-treonina fosfatase que apareceu na análise está depositada no PlasmoDB como Calcineurina (acesso UniProt Q8AM8). Sua função na biologia do parasito já foi descrita: parasitos Δcna são incapazes de invadir novos eritrócitos, já que a calcineurina faz a mediação entre o parasito e os receptores da célula hospedeira⁵²; esse primeiro contato entre parasito e célula hospedeira, que garante uma interação forte entre ambos, é crucial para garantir que a invasão seja bem sucedida. A deleção da calcineurina também tem como consequência a diminuição da formação de oocistos e formas exo-eritrocitárias em *P. berguei*, ambas associadas à redução da capacidade de colonização de ookinetos e esporozoítos, demonstrando que a proteína tem papel importante nas transições do ciclo de vida do parasito ⁵³.

A proteína serina/treonina fosfatase PP1 (acesso UniProt Q8ILV1) foi descrita experimentalmente por Kumar e colaboradores ⁵⁴, e abordagens feitas pelo grupo com siRNA demonstraram que o silenciamento do gene *pp1* inibia o crescimento do parasito e também inibia drasticamente a síntese de DNA desse (analisado pela diminuição acentuada da incorporação de hipoxantina pelo parasito); esses dados sugerem que PfPP1 tem um papel essencial na replicação do parasito ⁵⁴. PP1 também está relacionada com o processo de invasão: a proteína foi encontrada nos compartimentos de *Maurer's cleft*, e está relacionada à dinâmica de fosforilação da proteína transmembrana PfSBP1 (*skeleton-binding protein*): a inibição de PfPP1 resulta em uma hiperfosforilação de PfSBP1, e esse fato tem como consequência o não-rompimento do eritrócito para a liberação dos merozoítos, já que esse fato aumenta a estabilidade da membrana da hemácia ⁵⁵.

A terceira proteína fosfatase que apareceu na Tabela 7 (acesso UniProt Q8I2Q4) é uma PP2A putativa, anotada no PlasmoDB como proteína fosfatase beta, que teve seu gene e respectivo transcrito já descrito ⁵⁶; o transcrito aparece em todos os estágios do parasito.

Por fim, a proteína Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (acesso UniProt Q76NN7) é registrada no PlasmoDB como ciclofinina 19A. Ela já foi caracterizada bioquimicamente por Berriman & Fairlamb ⁵⁷. Os membros da família da ciclofilinas, em *P. falciparum* estão relacionados com atividades PPIase ou chaperona, oito desses membros foram expressos e estudados experimentalmente ^{58,59}.

Como o principal objetivo da busca através da metodologia de *data mining* era encontrar alguma proteína que fosse exclusiva do parasito e que tivesse potencial papel na invasão eritrocitária, a Hsp70-x, proteoforma citosólica da família Hsp70 expressa somente em *P. falciparum*, foi elencada para posteriores análises. Um resumo do processo é esquematizado na Figura 15:

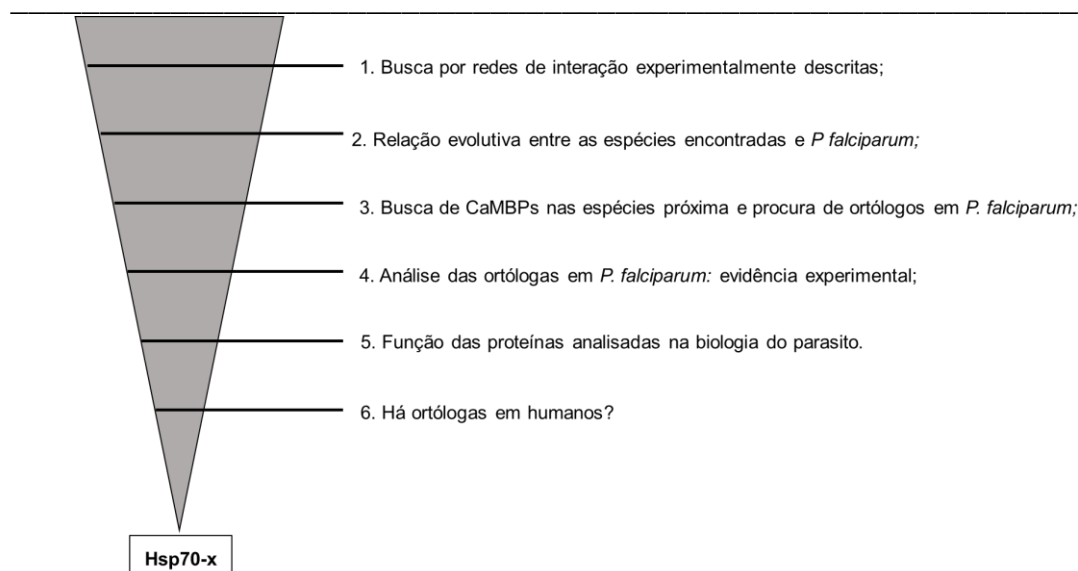


Figura 15. Infográfico que resume a estratégia de *data mining* utilizada na abordagem de *cross-reference species* desta tese e que culminou na escolha da Hsp70-x como proteína para posteriores análises bioinformáticas de interação com a calmodulina em *Plasmodium falciparum*.

5.1.4 Família Hsp70

Hsp70 é uma proteína (75kDa) ácida citoplasmática. Estruturalmente, ela se organiza da seguinte forma: a porção N-terminal possui domínio ATPase (domínio NBD, *nucleotide-binding domain*, em inglês), que hidrolisa ATP em ADP+P(i) e essa reação desencadeia uma mudança conformacional nas outras regiões da proteína; o segundo domínio é ligado ao domínio ATPase por um *linker* flexível e é responsável pela interação transitória da Hsp70-x com os substratos (domínio SBD, *substrate-binding domain* em inglês)⁶⁰. O domínio SBD possui um *pocket* que possui alta afinidade por resíduos neutros e hidrofóbicos.

A porção C-terminal da proteína é rica em alfas hélices, e essa estrutura funciona como uma “tampa” do *pocket* do SBD: quando a molécula de ATP se liga à Hsp70, essa tampa “abre” e os peptídeos que interagem com o SBD se ligam e se desligam rapidamente; quando é o ADP quem está ligado ao NBD, a tampa “fecha” e o substrato fica fortemente aderido ao SBD ⁶⁰. A estrutura genérica de uma Hsp70 está exemplificada na Figura 16:

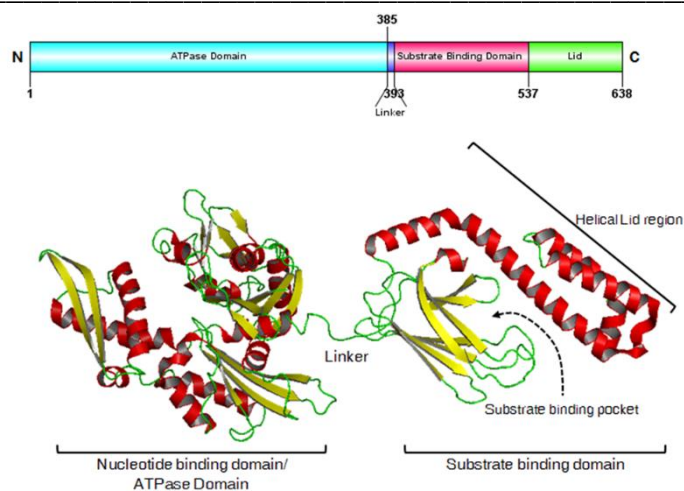


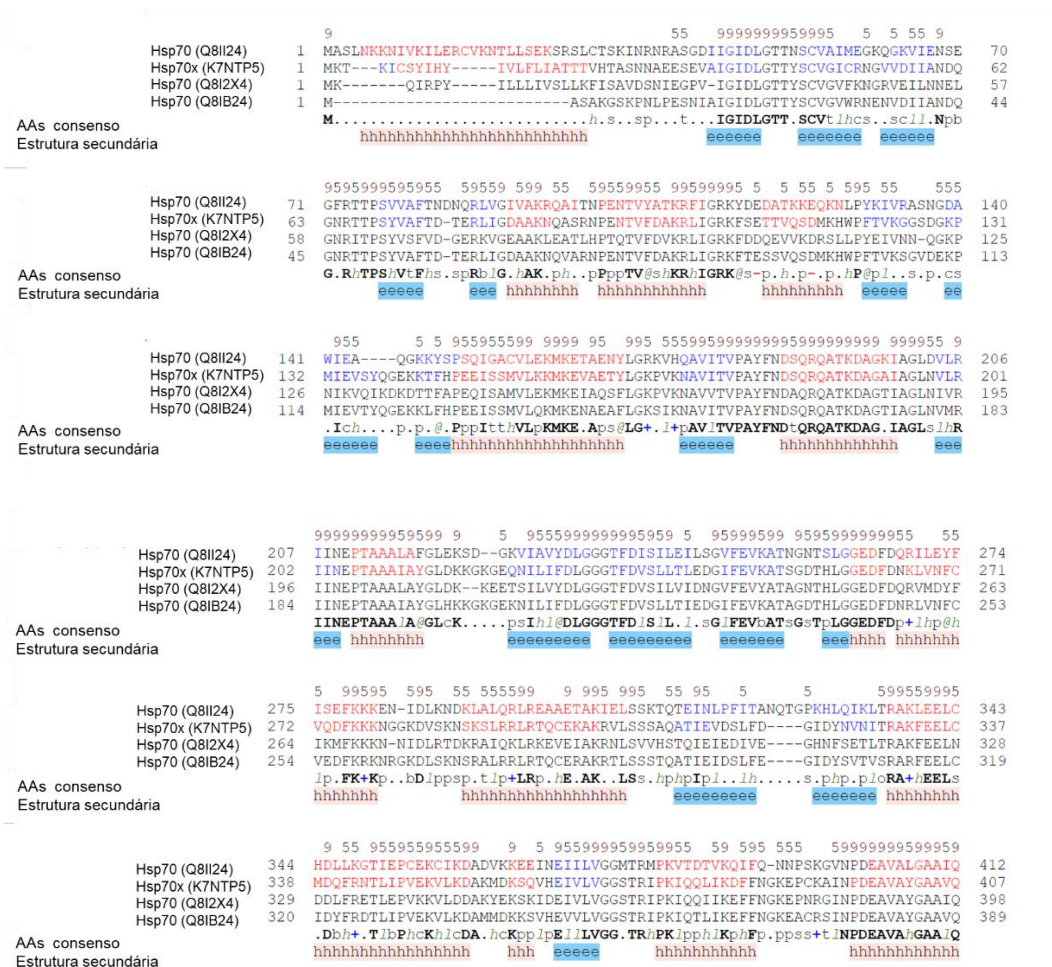
Figura 16. Estrutura genérica dos membros da família Hsp70, com destaque para os domínios de ligação ao ATP e ao substrato (NBD e SBD, respectivamente), além da região C-terminal, que funciona como “tampa” para o SBD. Retirado de <http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp70.php>

A família da Hsp70 está relacionada a diversos processos nos eucariotos, que envolvem desde otimização de *folding* proteico e minimização da formação de agregados, como “ajudar” na travessia de proteínas através de membranas em estado não-dobrado⁶⁰; esse grupo de chaperonas também é conhecido por trabalhar em cooperação com outras chaperonas⁶⁰.

No parasito, as chaperonas têm ganhado destaque nos estudos, por terem mostrado papel relevante para a sobrevivência do parasito nas mudanças de temperatura entre o vetor mosquito e o hospedeiro definitivo⁶¹. Em *P. falciparum* existem seis Hsp70, com possíveis localizações no citoplasma, retículo endoplasmático e mitocôndria do parasito⁶² (PfHsp70 1-3, respectivamente); a chaperona pode ser encontrada também em organelas como o apicoplasto, para mediar o correto tráfego de proteínas que venham do citosol para a organela⁶¹. É possível encontrar essa chaperona também fora do organismo, em compartimentos como o vacúolo parasitóforo as cisternas do tipo *Maurer's cleft*⁶¹. As proteínas da família Hsp70, assim como as demais chaperonas, tornam-se alvos interessantes para drogas porque, além das funções essenciais descritas acima, são proteínas que não estão sujeitas a

grandes modificações graças à seleção natural, exatamente pelo fato de exercerem papéis essenciais nos organismos ⁶³

Quatro Hsp70 de *P. falciparum* apareceram na análise de *cross-reference species*, a Hsp70x e mais 3 proteoformas já identificadas para o parasito. O alinhamento, demonstrado na Figura 17, mostra que há certo grau de diversidade entre as chaperonas. Essa diferença é esperada, mesmo que em membros da mesma família: tendo em vista os desafios que o parasito enfrenta durante o ciclo de vida, com mudanças de hospedeiro, de célula parasitada e de forma celular, é esperado que haja um arsenal diverso de chaperonas para gerenciar os diferentes tipos de problemas relacionados a *protein folding* que possam aparecer ⁶¹.



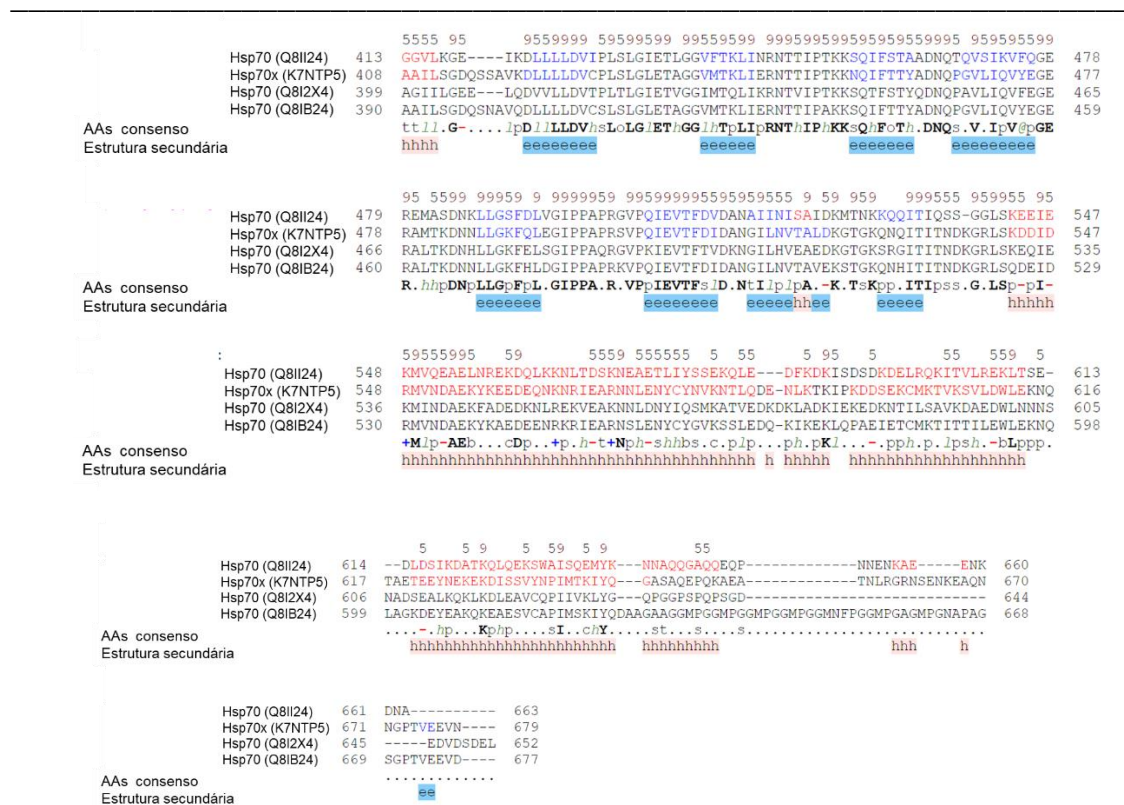


Figura 17. Alinhamento entre as sequências primárias das quatro proteoformas de Hsp70 que apareceram na análise de *cross reference species*. A figura final foi adaptada da gerada como resultado pelo software *PROMALS3D*⁶⁴ (<http://prodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.php>): as regiões grifadas em azul correspondem à predição de estrutura de folha beta, as regiões grifadas em rosa correspondem à predição de estrutura de alfa hélice.

5.1.5 Hsp70-x

A Hsp70-x é uma proteína citoplasmática, com alto percentual de homologia com relação à principal proteoforma citoplasmática da família, a Hsp70-1 (aproximadamente 73%)⁶¹. Todas as seis proteoformas de Hsp70 de *P. falciparum* possuem ortólogas em outros organismos, menos a Hsp70-x⁶³. A proteína foi encontrada nos eritrócitos do hospedeiro e no vacúolo parasitóforo⁶⁵, o que reforça o papel da família Hsp70 em mediar a travessia de proteínas através de membranas. De fato, a região N-terminal da proteína possui um peptídeo com características típicas de peptídeos-sinal relacionados a endereçamento de proteínas transitoriamente para o ER⁶³, o que permitiria a secreção da proteína para o vacúolo parasitóforo. Além disso, a sequência primária de Hsp70-x possui substituições em regiões que são conservadas em

outras Hsp70s, o que torna essa proteína um alvo interessante para futuros estudos de *drug design* ⁶³.

O complexo Hsp70 e Hsp40 é amplamente estudado, e tem sido investigado como alvo para várias doenças ⁶⁶. Estudos de *docking* entre as duas proteínas em *P. falciparum* mostrou que Hsp70-x é capaz de interagir com as três proteoformas identificadas no parasito de Hsp40, além de interagir de maneira semelhante com a proteoforma humana dessa chaperona ⁶³. Experimentalmente, foi demonstrado que Hsp70-x co-localiza com Hsp40 em uma estrutura conhecida como *J-dots*, que é exportada para o vacúolo parasitóforo ⁶⁵. Ademais, Hsp70-x também co-localiza com o fator de virulência PfEMP1 nos primeiros estágios do ciclo intraeritrocitário do parasito em ensaios de fluorescência, além de ter sido demonstrado que as três proteínas interagem na forma de complexo através de ensaios de *proximity ligation assay* ⁶⁵. Parasitos Δ *hsp70-x* não tem o crescimento afetado, porém a exportação de PfEMP1 é prejudicada ⁶⁷.

A família Hsp70 tem um domínio de interação com a calmodulina bem descrito e conservado⁶⁸⁻⁷⁰. Esse domínio consiste em uma sequência de 21 aminoácidos posicionados aproximadamente na mesma posição na proteína - a partir do aminoácido 250, com pequenas variações para antes ou para depois, e que possuem a estrutura secundária em alfa hélice, algo em comum na maioria das proteínas alvo da calmodulina¹⁸. Para verificar se a Hsp70-x possuía esse mesmo domínio, alinhou-se a sequência da proteína com as sequências de Hsp70 de camundongo⁶⁸ e milho⁶⁹, que possuem evidências experimentais da interação desse peptídeo com a calmodulina:

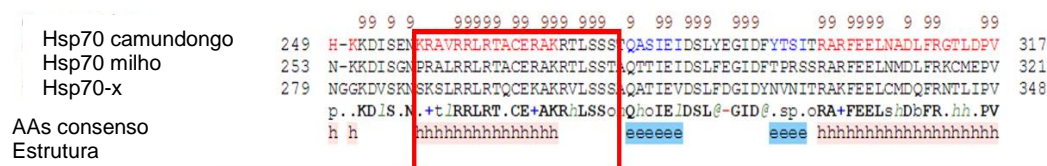


Figura 18. Alinhamento entre as sequências de Hsp70-x de *Plasmodium falciparum* e Hsp70 de *Mus musculus* e *Maize maize*, demonstrando que existe uma alta porcentagem de identidade entre aos peptídeos que interagem com a calmodulina, além de todas possuírem esse peptídeo

formando uma alfa hélice como estrutura secundária. A figura final foi adaptada da gerada como resultado pelo software PROMALS3D⁶⁴ (<http://prodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.php>): as regiões grifadas em azul correspondem à predição de estrutura de folha beta, as regiões grifadas em rosa correspondem à predição de estrutura de alfa hélice.

Percebe-se que há um consenso tanto de sequência primária quanto de estrutura secundária entre os três alinhamentos, 62% de similaridade entre a proteína no parasito e a ortóloga no mamífero, o que é um forte indício de que a Hsp70-x interaja com a calmodulina durante o ciclo intraeritrocitário de *Plasmodium falciparum*.

Visando entender melhor a relevância desse complexo proteico no ciclo intraeritrocitário de *P. falciparum*, foram efetuadas tentativas de expressão de ambas as proteínas para posteriores estudos, bem como foram performados ensaios de cromatografia de afinidade à calmodulina e de BN-PAGE, visando encontrar experimentalmente o complexo durante o processo de esquizogonia, para se inferir a relevância desse para a biologia do parasito.

5.2 Expressão heteróloga de proteínas recombinantes de *P. falciparum*

5.2.1 Calmodulina

A indução da expressão da Calmodulina foi feita em três horas e 1mM de IPTG. Como a taxa de expressão foi bem alta, testou-se também a possibilidade de indução da expressão com 0,1mM de IPTG. Os resultados são os apresentados a seguir:

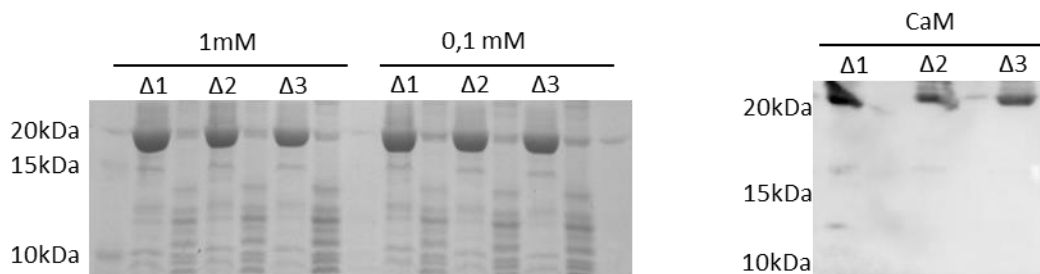


Figura 19. Expressão heteróloga de CaM em BL21-AI™: gel SDS-PAGE 12%, mostrando a proteína expressa na porção solúvel dos clones, com massa molecular de aproximadamente 21kDa (figura à esquerda); *Western Blotting* do gel SDS-PAGE, com anticorpo anti His-tag, mostrando a expressão da calmodulina na porção solúvel dos três clones (figura à direita).

A purificação de PfCaM foi realizada por cromatografia do tipo IMAC, descrita no tópico 4.2.4.5. A maior concentração da proteína foi eluída em 100mM de imidazol, conforme visto na figura abaixo:

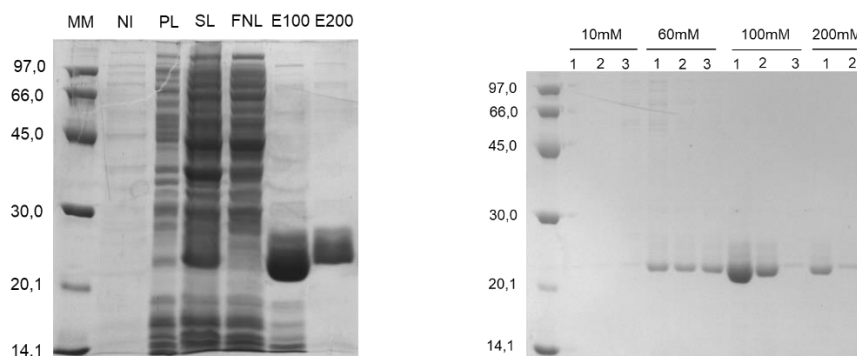


Figura 20. Resumo da purificação da calmodulina por cromatografia de afinidade à níquel. Figura à esquerda: M- marcador molecular, NI- bactéria não-induzida, PL- *pellet* da lise por sonicação, SL- sobrenadante da lise por sonicação, FNL- fração não-ligada da cromatografia, E100- eluição com 100mM de imidazol (m/v), E200- eluição com 200mM de imidazol (m/v). Figura à direita: Recromatografia de PfCaM. Extrações com 10, 60, 100 e 200mM de imidazol. As amostras 100mM (3) e 200mM (1) foram trocadas na hora da aplicação no gel.

5.3 Blue-Native PAGE como estratégia para estudo dos complexos de PfCaM

Outra estratégia experimental que foi testada para se estudar os complexos que envolviam PfCaM foi a identificação de complexos por BN-PAGE. Primeiramente, foi otimizado o protocolo de separação dos complexos. O protocolo de Sanders e colaboradores⁷³ não se mostrou eficiente para separar os complexos da amostra testada, mesmo que esse protocolo tenha sido usado para o mesmo tipo de amostra – parasitos do ciclo intraeritrocitário, enriquecido em esquizontes. Optou-se pela utilização do protocolo original descrito no tópico 4.8. O resultado é o apresentado na Figura 21:

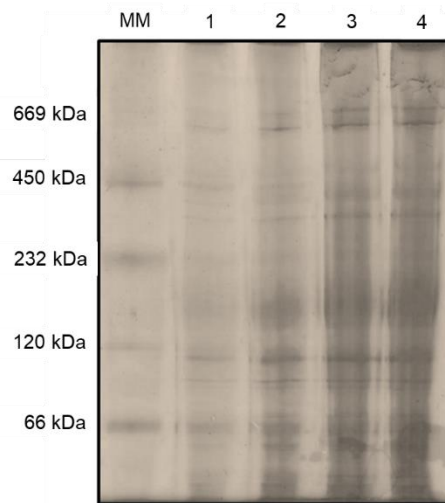


Figura 21. Análise de complexos proteicos solúveis da forma esquizonte de *P. falciparum* por BN-PAGE. Os complexos foram separados em uma malha de 5 – 18% ABA e as amostras foram concentradas em um gel concentrador a 4% ABA. Foram aplicadas concentrações crescentes de amostra para otimização. MM: marcador molecular, 1: 5µg, 2: 10 µg, 3: 15 µg, 4: 20 µg.

5.4 Estabelecimento de protocolo de Cromatografia de Afinidade à Calmodulina para estudo das interações de PfCaM

A cromatografia de afinidade à calmodulina foi a estratégia mais bem-sucedida para a elucidação das interações realizadas pela PfCaM durante a esquizogonia em *P. falciparum*. O extrato bruto do parasito foi passado em uma coluna carregada com *beads* de Sepharose® 4B, que continha a proteína calmodulina bovina ligada covalentemente. Tendo em vista que as proteínas têm alta porcentagem de identidade, conforme indicado na Figura 22, não houve prejuízo na inferência de interações de PfCaM.

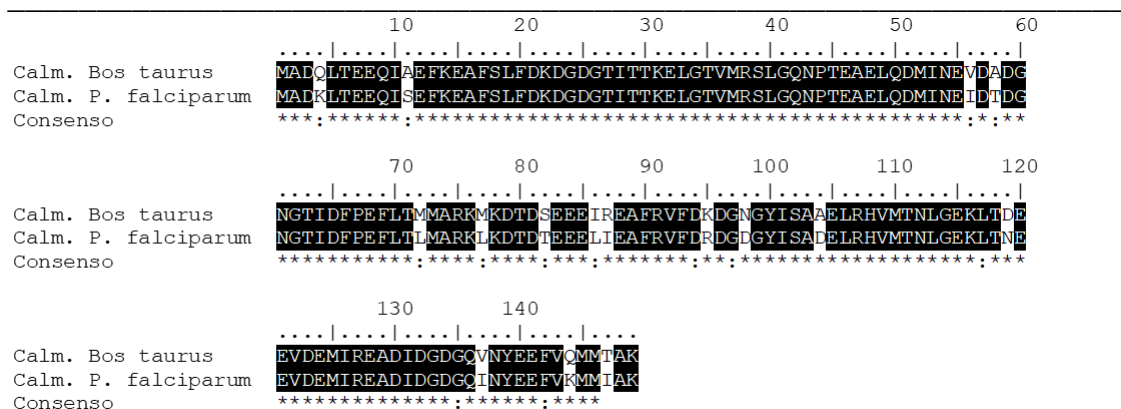


Figura 22. Alinhamento entre PfCaM e CaM de *Bos taurus* (calmodulina bovina). As proteínas compartilham identidade de 89% e positivos (considerando mudanças conservadas) de 96%. O alinhamento foi realizado pelo software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e editado pelo software BioEdit.

O ensaio de cromatografia de afinidade foi performedo conforme descrito na seção 4.2.4.5 da Metodologia. A lista final das proteínas identificadas está detalhada nas tabelas contidas nos anexos.

O fato de o experimento ter sido realizado no gelo pode também ter diminuído a ação de proteases durante o experimento, o que pode justificar o aumentado número de proteínas. Também foi testada

a hipótese de as proteínas resultantes do experimento interagirem inespecificamente com a resina em que a CaM porcina estava fixada – Sepharose® 4B. O extrato bruto foi passado na resina, e a extração das possíveis proteínas foi feita com tampão de equilíbrio contendo uréia 8M. Não foram identificadas proteínas nesse experimento (dados não apresentados).

Para se analisar as proteínas resultantes da cromatografia de afinidade, partiu-se da lista de proteínas que foram descritas interagindo com PfCaM no ensaio de interação proteína-proteína em *P. falciparum*³¹: as parceiras de PfCaM que foram encontradas nas eluições da cromatografia foram analisadas no banco de dados de interação do STRING, para verificar suas redes de interação. Foi verificado posteriormente se as proteínas contidas nessa rede apareceram nas eluições da cromatografia de afinidade. Essa análise foi apresentada na Tabela 8.

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Tabela 8. Proteínas identificadas no experimento de Cromatografia de Afinidade à Calmodulina que também foram identificadas no ensaio de duplo híbrido para PfCaM performed por LaCount *et al*³¹.

Ac. PlasmoDB	Ac. UniProt	Proteína	Eluição	Parceira de PfCaM no Y2H
PF3D7_1435300	Q8ILB1	NAD(P)H-dependent glutamate synthase, putative	–	PDI 8
PF3D7_0917900	Q8I2X4	heat shock protein 70	e3, e2, e1	PDI 8
PF3D7_121500	Q8I5Q6	Thioredoxin peroxidase 2	–	PDI 8
PF3D7_1344200	C0H5H0	Heat shock protein 70 (Hsp70), putative	–	PDI 8
PF3D7_1438900	Q8IL80	Thioredoxin peroxidase 1	–	PDI 8
PF3D7_1124000	Q8IIC3	Endoplasmic reticulum oxidoreductin, putative	–	PDI 8
PF3D7_1352500	Q8IDH5	Thioredoxin-related protein, putative	–	PDI 8
PF3D7_0818900	Q8IB24	Heat shock 70 kDa protein	e3, e2, e1	PDI 8
PF3D7_1108700	Q8IIR6	Heat shock protein DnaJ homologue Pfj2	e3	PDI 8
PF3D7_1346100	Q8IDN6	Protein transport protein SEC61 subunit alpha	–	PDI 8
PF3D7_0930300	Q8IU08	Merozoite surface protein 1	e3, e2, e1	SERA 5
PF3D7_0929400	C0H571	High molecular weight rhoptry protein-2	e3, e2, e1	SERA 5
PF3D7_1228600	Q8I5D2	101 kDa malaria antigen MSP 9	e3, e2, e1	SERA 5
PF3D7_1335100	Q8IDX8	Merozoite Surface Protein 7	e2,	SERA 5
PF3D7_1410400	Q8ILZ1	Rhoptry-associated protein 1	e3, e2, e1	SERA 5
PF3D7_1364100	Q8ID66	Merozoite surface protein P92	–	SERA 5
PF3D7_0905400	Q8I395	Rhoptry antigen protein	e3,	SERA 5
PF3D7_0310400	O77361	Putative uncharacterized protein	–	SERA 5
PF3D7_1252100	Q8I4R5	Rhoptry neck protein 3, putative	–	SERA 5
PF3D7_0503400	Q8I467	Cofilin/actin-depolymerizing factor homolog 1	–	Actina 1
PF3D7_0613900	C6KSY1	Myosin E	–	Actina 1
PF3D7_0105300	Q8I288	Adenylyl cyclase-associated protein	–	Actina 1
PF3D7_1361400	Q8ID92	Cofilin/actin-depolymerizing factor homolog 2	–	Actina 1
PF3D7_0934800	Q7K6A0	CAMP-dependent protein kinase/CAMP-dependent protein kinase catalytic subunit	–	Actina 1
PF3D7_1342600	Q8IDR3	Myosin-A	–	Actina 1
PF3D7_1251200	Q8I4S2	Coronin	–	Actina 1
PF3D7_1446600	Q8IL07	Centrin-2	–	Actina 1
PF3D7_1145200	Q8IHR5	Ser/Thr protein kinase, putative	–	Actina 1
PF3D7_0932200	Q8I2J4	Profilin	–	Actina 1
PF3D7_1228600	Q8I5D2	MSP9 (101 kDa malaria antigen)	e3, e2, e1	MSP 1
PF3D7_1410400	Q8ILZ1	Rhoptry-associated protein 1, RAP1	e3, e2, e1	MSP 1
PF3D7_1335100	Q8IDX8	Merozoite Surface Protein 7, MSP7	e2,	MSP 1
PF3D7_0207600	Q9TY95	Serine-repeat antigen protein sera 5	e3, e2, e1	MSP 1
PF3D7_1035500	Q8IJ54	Merozoite surface protein 6	e2	MSP 1
PF3D7_1035400	Q8IJ55	Merozoite surface protein 3	e3, e2, e1	MSP 1
PF3D7_1133400	Q7KQK5	Apical membrane antigen 1	–	MSP 1
PF3D7_0207000	Q7KQJ2	Merozoite surface protein 4	–	MSP 1
PF3D7_0206800	P50498	Merozoite surface antigen 2	e3	MSP 1
PF3D7_0905400	Q8I395	High molecular weight rhoptry protein 3	–	MSP 1
PF3D7_1434200	P62203	Calmodulin	e2	PP2B
PF3D7_1145200	Q8IHR5	Ser/Thr protein kinase, putative	–	PP2B
PF3D7_1451700	Q8IKV9	Calcineurin B subunit	e2	PP2B
PF3D7_1323700	Q8IE80	Glideosome associated protein with multiple membrane spans 1	–	PP2B
PF3D7_0817700	C0H4V4	Rhoptry neck protein 5	–	PP2B
PF3D7_0407800	Q9U0K8	Putative uncharacterized protein	–	PP2B
PF3D7_0515700	Q8I3V1	Glideosome-associated protein 40, putative	–	PP2B
PF3D7_1435600	Q8ILA8	Putative uncharacterized protein	–	PP2B
PF3D7_1025900	Q8IJE4	Conserved Plasmodium protein	–	PP2B
PF3D7_1232500	Q8I597	CG2-related protein, putative	–	PP2B

Fontes: STRING (<https://string-db.org>) e LaCount *et al.*³¹

Dessa forma, é possível prever possíveis complexos proteicos que envolvam PfCaM, de forma que essas vias possam ser posteriormente exploradas em outros estudos:

A **actina-1 (PF3D7_1246200)**, é uma das duas actinas previstas no genoma de *P. falciparum*, e é expressa em todos os estágios do ciclo de vida do parasito ⁴⁶. A actina-1 é descrita como essencial para a segregação correta do apicoplasto durante o processo de multiplicação celular em *P. falciparum*, além de garantir a correta citocinese entre as células-filhas durante o processo ⁷⁴. Tendo em vista que a taxa de multiplicação celular durante o processo de esquizogonia é alta, é esperado que essa proteína seja encontrada em grandes quantidades no experimento. Ademais, acrescenta-se mais uma evidência experimental da interação entre as duas proteínas.

A **Ser/treo fosfatase (PF3D7_0802800)** também é depositada no banco de dados de *P. falciparum* como **Calcineurina**. Essa fosfatase já é descrita na literatura como parceira da calmodulina, e já teve seu sítio de ligação à proteína descrito em *P. falciparum* ⁷⁵. Foi demonstrado que a PfCnA está intimamente relacionada à invasão de novos eritrócitos pelos merozoítos: os parasitos usam PfCn para interagirem e se conectarem fortemente com a membrana dos eritrócitos antes da entrada na célula, tendo em vista que o processo de invasão de hemácias acontece com as células – hospedeira e do parasito – submetidas à velocidade da corrente sanguínea ⁵²; essa interação está relacionada ao reconhecimento pelo parasito dos receptores AMA1 da célula hospedeira, e precede ao processo puramente mecânico da invasão, como a polimerização da actina relacionada ao processo de *gliding* ⁵². O experimento de cromatografia de afinidade à calmodulina encontrou essa proteína – que é a subunidade catalítica da calcineurina – mas também encontrou sua subunidade regulatória, a PfCnB, o que reforça a potencial relevância desse complexo – PfCnA/PfCnB/PfCaM – no preparo do merozoíto para invadir novas hemácias: PfCaM, por ser um tampão de cálcio, pode responder mais rapidamente à mudança desse íon, preparando PfCnA/PfCnB, que estarão aptas a auxiliar no rápido processo de reconhecimento da célula a ser parasitada pelo parasito.

A proteína **SERA 5** (*serine-rich antigen 5*) faz parte de uma família de proteínas solúveis que se acumulam no interior do PV durante o processo de esquizogonia, e é, dos membros dessa família, a mais expressa durante o ciclo intraeritrocitário de *P. falciparum*. Essa proteína é clivada por uma serina protease em duas ou três posições, e essa “ativação” está diretamente relacionada ao papel de SERA 5⁷⁶. Ela funciona como um regulador do egresso dos merozoítos da hemácia, agindo como um temporizador e garantindo que os parasitos egressem no “tempo correto”: merozoítos Δ sera5 egressam de forma prematura das hemácias, e não tem um espalhamento na corrente sanguínea satisfatório⁷⁷; esse acúmulo de merozoítos parece estar relacionado ao aprisionamento temporários desses parasitos aos pedaços de membranas da hemácia e do PV, já que essas membranas se romperam prematuramente e de maneira inadequada⁷⁷.

Fica evidenciado que a existência dessa *lag phase* é essencial para o parasito, seja para a liberação de mais moléculas efetoras essenciais para o processo de invasão, seja para que haja o correto colapso do citoesqueleto da membrana do eritrócito, o que garantiria o egresso eficiente do parasito; e SERA 5 parece ter exatamente esse papel de “segurar” esse egresso até a hora ideal. Nesse contexto, a interação entre essa proteína e PfCaM pode estar relacionada como uma molécula efetora desse *timing*, já que existe um período entre a proteólise de SERA 5 por SUB 1 e o egresso dos parasitos.

Como outras proteínas que também são processadas por SUB1 apareceram na cromatografia de afinidade à CaM, como por exemplo MSP1, pensou-se na possibilidade de essa protease ser também ativada por PfCaM. Para investigar tal possibilidade, usou-se o *software Calmodulation Database and Metanalise Predictor*²⁰ (<http://cam.umassmed.edu>), que analisa características biofísicas e bioquímicas das sequências depositadas como *query* em busca dos motivos descritos como CBD. O *score* para a protease foi baixo (Figura 1, anexos), o que exclui por ora essa possibilidade. PfCaM pode, então, estar presente como uma reguladora dos produtos de PfSUB1. De fato,

conforme discutido no tópico 5.1.3, PfCaM pode estar relacionada com a regulação da fosfatase PP1, que regula indiretamente a estabilidade da membrana da hemácia ao de-fosforilar a proteína PfSB1; o que acrescenta mais um dado que corrobora a potencial relevância dessa proteína para a eficiente liberação dos merozoítos e posterior invasão de novas hemácias. Ademais, PfCaM aparece acumulada na região apical dos merozoítos, conforme demonstrado por Scheibel ²⁷ e apresentado na figura 10 dessa tese.

Vale a pena destacar também a quantidade expressiva de chaperonas que foram encontradas nesse experimento. No tópico 5.1.4 foi discutida a importância das Hsp70s para a manutenção da integridade das proteínas durante as passagens do hospedeiro para o mosquito, e vice-versa. Além disso, conforme também discutido no tópico, algumas chaperonas agem em cooperação para garantir que fatores de virulência cheguem íntegros à membrana do eritrócito. Outras chaperonas são importantes para a manutenção de estruturas essenciais para a estrutura tridimensional da proteína, como as pontes dissulfeto. A chaperona **PDI8** é descrita como responsável em garantir o correto dobramento de alguns fatores de virulência importantes, como PfEMP1, MSP1 e EBA-175, além de possuir um peptídeo-sinal de retenção no ER ⁷⁸. É sabido que a família das Hsp70s possui um domínio de ligação à calmodulina bem estabelecido, e que algumas proteoformas são encontradas fora do vacúolo parasitóforo, conforme já discutido. A PDI8 também foi descrita interagindo com PfCaM no ensaio de duplo híbrido que descreveu algumas redes de interação em *P. falciparum* ³¹. O aparecimento dessas chaperonas, bem como de algumas moléculas efetoras e fatores de virulência na cromatografia de afinidade aumenta o espectro de processos que pode ser mediado pela PfCaM.

Percebeu-se também muitas proteínas que não são relatadas na literatura interagindo com PfCaM. De acordo com o *software* DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), que analisa o enriquecimento de uma dada lista de genes depositada como *query*, a partir dos códigos gerados pelo *software* KEGG (<https://david.ncifcrf.gov/>). Como se trata de um momento do ciclo

intraeritrocitário com alta taxa de multiplicação, o resultado encontrado era esperado. As principais categorias de genes que foram encontradas estão relacionadas à:

- síntese proteica (ribossomos): 40 *hits*
- síntese de aminoácidos: 13 *hits*
- metabolismo de carboidratos: 10 *hits*
- replicação de DNA: 11 *hits*
- processamento de proteínas pelo ER: 13 *hits*

Conforme já foi debatido na introdução, PfCaM possui alto percentual de identidade com a calmodulina humana, o que a descarta como potencial alvo terapêutico para o combate da malária. As proteínas que interagem com PfCaM foram demonstradas aqui como potenciais alvos, tendo em vista que algumas regulam processos essenciais na evasão do parasito e na colonização de novas hemácias. Pode-se, a partir do que foi discutido nessa tese, obter fármacos que ou impeçam alguma parceira de PfCaM de realizar suas funções, ou que impeçam a interação entre PfCaM e sua proteína parceira. Abrem-se novas possibilidades, então, para posteriores estudos visando o combate dessa doença.

6 CONCLUSÕES

A presente tese usou de estratégias bioinformáticas e experimentais para estudar interações realizadas por PfCaM durante o processo de esquizogonia e invasão eritrocitária em *Plasmodium falciparum*. Foi demonstrado que, por ser uma proteína essencial para a manutenção da vida em eucariotos e por consequência sofrer poucas modificações durante o processo de evolução das espécies, as interações realizadas pela calmodulina são mantidas em espécies próximas. Essa característica pode ser usada como ferramenta para o *screening* de interações entre essa proteína e suas parceiras em espécies que possuem pouca informação experimental de interatoma.

O trabalho também mostrou a capacidade de ferramentas simples em gerar dados interessantes para debates. A cromatografia de afinidade foi usada aqui como melhor estratégia para se estudar as interações entre PfCaM e suas parceiras durante o processo de esquizogonia e invasão de novas hemácias. Além de corroborar dados já encontrados na literatura, a abordagem apontou novas possibilidades de interação, bem como apontou a PfCaM como possível agente regulador, que garante que a invasão de novas hemácias aconteça no momento correto.

Tendo em vista que a PfCaM não pode ser usada como alvo de drogas para o combate da malária, estratégias que visam elucidar os possíveis parceiros dessa proteína tem como meta encontrar interações essenciais para o parasito que possam ser interrompidas e, consequentemente, impedir a continuidade da reprodução do parasito. Além disso, se alguma dessas proteínas for exclusiva do parasito, ela em si pode ser estudada como possível alvo para drogas. Esse é o caso da Hsp70-x, proteína que surgiu como potencial alvo pela estratégia bioinformática utilizada nessa tese, e que posteriormente apareceu na abordagem experimental.

7 PERSPECTIVAS

Muito embora algumas proteínas aqui estudadas tenham sido extensivamente caracterizadas em *P. falciparum*, suas relações com a calmodulina não foram exploradas. Espera-se com essa tese abrir novas possibilidades de estudo e interação de proteínas essenciais para o parasito com PfCaM. Especificamente:

- Se PfCaM é responsável por ativar as moléculas efetoras relacionadas com a evasão dos merozoítos, como SERA 5;
- Qual a relação entre PfCaM e as chaperonas encontradas nas diferentes abordagens desse estudo;
- Se PfCaM está relacionada com a exportação de fatores de virulência, ou está relacionada à ativação das chaperonas que ajudam na exportação desses valores;
- Dentre as chaperonas, estudar a interação entre PfCaM e Hsp 70-x, tendo em vista que essa proteína é única no parasito, e é uma potencial candidata a alvo de fármacos para o combate da malária.

8 BIBLIOGRAFIA

1. WHO. World Malaria Report 2014. (2014).
2. WHO. World Malaria Report 2015. (2015).
3. World Health Organization. Treatment of Severe Malaria. *Guidel. Treat. Malar.* 71–88 (2015). doi:10.1016/0035-9203(91)90261-V
4. Greenwood, B. Anti-malarial drugs and the prevention of malaria in the population of malaria endemic areas. *Malar. J.* **9 Suppl 3**, S2 (2010).
5. Cui, L., Mharakurwa, S., Ndiaye, D., Rathod, P. K. & Rosenthal, P. J. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**, 57–68 (2015).
6. Dondorp, A. M. *et al.* Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. *N Engl J Med* **361**, 455–467 (2012).
7. Mok, S., *et al.* Drug resistance. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science (80-.).* **347**, 431–435 (2015).
8. Mendonça, V. R. R. *et al.* Unravelling the patterns of host immune responses in Plasmodium vivax malaria and dengue co-infection. *Malar. J.* **14**, 315 (2015).
9. Magalhães, B. M. L. *et al.* P. vivax Malaria and Dengue Fever Co-infection: A Cross-Sectional Study in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, (2014).
10. Rahmah, Z., Sasmito, S. D., Siswanto, B., Sardjono, T. W. & Fitri, L. E. Parasitemia induces high plasma levels of interleukin-17 (IL-17) and low levels of interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor-?? (TGF-

- ??) in pregnant mice infected with malaria. *Malaysian J. Med. Sci.* **22**, 25–32 (2015).
11. Bannister, L. & Mitchell, G. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol.* **19**, 209–213 (2003).
 12. Salmon, B. L., Oksman, a & Goldberg, D. E. Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 271–276 (2001).
 13. Smith, R. C., Vega-Rodríguez, J. & Jacobs-Lorena, M. The Plasmodium bottleneck: Malaria parasite losses in the mosquito vector. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **109**, 644–661 (2014).
 14. Simonetti, A. B. The biology of malarial parasite in the mosquito - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **91**, 519–541 (1996).
 15. Leninger. *Principles of biochemistry.* **XXXIII**, (2012).
 16. Zhang, M., Tanaka, T. & Ikura, M. Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nat Struct Biol* **2**, 758–767 (1995).
 17. Kursula, P. The many structural faces of calmodulin: a multitasking molecular jackknife. *Amino Acids* **46**, 2295–2304 (2014).
 18. Hoeflich, K. P. & Ikura, M. Calmodulin in action: Diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* **108**, 739–742 (2002).
 19. Rhoads, R. & Friedberg, F. Sequence motifs for Calmodulin recognition. *FASEB J.* **11**, 331–340 (1997).
 20. Mruk, K., Farley, B. M., Ritacco, a. W. & Kobertz, W. R. Calmodulation meta-analysis: Predicting calmodulin binding via canonical motif clustering. *J. Gen. Physiol.* **144**, 105–114 (2014).
 21. Cowman, A. F. & Galatis, D. Plasmodium falciparum : The Calmodulin

- Gene is Not Amplified or Overexpressed in Chloroquine Resistant or Sensitive Isolates ' The calcium binding protein calmodulin larial drugs since chloroquine , quinine , and quinicine do have some apparent anti-is . **275**, 269–275 (1991).
22. Orfa Rojas, M. & Wasserman, M. Stage-specific expression of the calmodulin gene in *Plasmodium falciparum*. *J. Biochem.* **118**, 1118–23 (1995).
23. Gardner, M. J. *et al.* Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2 , 10 , 11 and 14. *October* **419**, 531–534 (2002).
24. Gardner, M. J. *et al.* Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**, 498–511 (2002).
25. Wasserman, M., Alarcon, C. & Mendoza, P. M. Effects of Ca^{++} depletion on the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**, 711–717 (1982).
26. Nickell, S. P., Scheibel, L. W. & Cole, G. A. Inhibition by cyclosporin A of rodent malaria in vivo and human malaria in vitro. *Infect. Immun.* **37**, 1093–1100 (1982).
27. Scheibel, L. W. *et al.* Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*): implications for drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7310–7314 (1987).
28. Geary, T. G., Divo, a a & Jensen, J. B. Effect of calmodulin inhibitors on viability and mitochondrial potential of *Plasmodium falciparum* in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 785–8 (1986).
29. Robson, K. J. H., Gamble, Y. & Acharya, K. R. Molecular Modelling of Malaria Calmodulin Suggests that it is not a Suitable Target for Novel Antimalarials. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **340**, 39–53 (1993).
30. Vaid, a., Thomas, D. C. & Sharma, P. Role of Ca^{2+} /Calmodulin-PfPKB

- Signaling Pathway in Erythrocyte Invasion by *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **283**, 5589–5597 (2007).
31. LaCount, D. J. *et al.* A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **438**, 103–107 (2005).
32. Mitrofanova, A., Kleinberg, S., Carlton, J., Kasif, S. & Mishra, B. Predicting malaria interactome classifications from time-course transcriptomic data along the intraerythrocytic developmental cycle. *Artif. Intell. Med.* **49**, 167–176 (2010).
33. Date, S. V & Stoeckert Jr, C. J. Computational modeling of the *Plasmodium falciparum* interactome reveals protein function on a genome-wide scale. *Genome Res.* **16**, 542–549 (2006).
34. Wuchty, S., Adams, J. H. & Ferdig, M. T. A comprehensive *Plasmodium falciparum* protein interaction map reveals a distinct architecture of a core interactome. *Proteomics* **9**, 1841–1849 (2009).
35. Administrator. Methods In Malaria Research. 1–351 (2008).
36. Elias, J. E. & Gygi, S. P. Proteome Bioinformatics. *Methods Mol. Biol.* **604**, 55–71 (2010).
37. Fiala, G. J., Schamel, W. W. A. & Blumenthal, B. Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) for Analysis of Multiprotein Complexes from Cellular Lysates. *J. Vis. Exp.* 1–8 (2011). doi:10.3791/2164
38. Schagger, H., Cramer, W. & Jagow, G. von. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by BN-PAGE and isolation of membrane complexes by 2DNative electrophoresis. *Anal. Biochem.* **2017**, 220–230 (1994).
39. Schagger, H. & von Jagow, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal.*

- Biochem.* **199**, 223–231 (1991).
40. Ghoorah, A., Devignes, M.-D., Alborzi, S., Smaïl-Tabbone, M. & Ritchie, D. A Structure-Based Classification and Analysis of Protein Domain Family Binding Sites and Their Interactions. *Biology (Basel)*. **4**, 327–343 (2015).
 41. Ghoorah, A. W., Devignes, M. D., Smaïl-Tabbone, M. & Ritchie, D. W. KBDOCK 2013: A spatial classification of 3D protein domain family interactions. *Nucleic Acids Res.* **42**, 389–395 (2014).
 42. Hoeflich, K. P. & Ikura, M. Calmodulin in Action Diversity in Target Recognition and Activation Mechanisms. *Cell* **108**, 739–742 (2002).
 43. Ramaprasad, A., Pain, A. & Ravasi, T. Defining the protein interaction network of human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genomics* **99**, 69–75 (2012).
 44. Siden-Kiamos, I., Schüler, H., Liakopoulos, D. & Louis, C. Arp1, an actin-related protein, in *Plasmodium berghei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **173**, 88–96 (2010).
 45. Gordon, J. L. & Sibley, L. D. Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics* **6**, 1–13 (2005).
 46. Wesseling, J. G., Smits, M. A. & Schoenmakers, J. G. G. Extremely diverged actin proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **30**, 143–153 (1988).
 47. Vahokoski, J. *et al.* Structural Differences Explain Diverse Functions of *Plasmodium* Actins. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
 48. Yusuf, N. A. *et al.* The *Plasmodium* class XIV Myosin, MyoB, has a distinct subcellular location in invasive and motile stages of the malaria parasite and an unusual light chain. *J. Biol. Chem.* **290**, 12147–12164

- (2015).
49. Chaparro-Olaya, J. *et al.* Plasmodium falciparum myosins: Transcription and translation during asexual parasite development. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 200–213 (2005).
 50. Foth, B. J., Goedecke, M. C. & Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 3681–3686 (2006).
 51. Jacot, D., Daher, W. & Soldati-Favre, D. Toxoplasma gondii myosin F, an essential motor for centrosomes positioning and apicoplast inheritance. *EMBO J.* **32**, 1702–1716 (2013).
 52. Paul, A. S. *et al.* Parasite Calcineurin Regulates Host Cell Recognition and Attachment by Apicomplexans. *Cell Host Microbe* **18**, 49–60 (2015).
 53. Philip, N. & Waters, A. P. Conditional degradation of plasmodium calcineurin reveals functions in parasite colonization of both host and vector. *Cell Host Microbe* **18**, 122–131 (2015).
 54. Kumar, R., Adams, B., Oldenburg, A., Musiyenko, A. & Barik, S. Characterisation and expression of a PPI serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite , Plasmodium falciparum: demonstration of its essential rone using RNA interference. *Malar. J.* **11**, 1–11 (2002).
 55. Blisnick, T., Vincensini, L., Fall, G. & Braun-Breton, C. Protein phosphatase 1, a Plasmodium falciparum essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites. *Cell. Microbiol.* **8**, 591–601 (2006).
 56. Li, J. L. & Baker, D. A. Protein phosphatase beta, a putative type-2a protein phosphatase from the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Eur. J. Biochem.* **249**, 98–106 (1997).

57. Berriman, M. & Fairlamb, A. H. Detailed characterization of a cyclophilin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **334** (Pt 2, 437–45 (1998).
58. Marín-Menéndez, A. & Bell, A. Overexpression, purification and assessment of cyclosporin binding of a family of cyclophilins and cyclophilin-like proteins of the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Protein Expr. Purif.* **78**, 225–234 (2011).
59. Marín-Menéndez, A., Monaghan, P. & Bell, A. A family of cyclophilin-like molecular chaperones in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **184**, 44–47 (2012).
60. Clerico, E. M., Tilitky, J. M., Meng, W. & Gierasch, L. M. How Hsp70 Molecular Machines Interact with Their Substrates to Mediate Diverse Physiological Functions. *J. Mol. Biol.* **427**, 1575–1588 (2015).
61. Shonhai, A., Boshoff, A. & Blatch, G. L. The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from *Plasmodium falciparum*. *Protein Sci.* **16**, 1803–1818 (2007).
62. Hatherley, R., Blatch, G. L. & Bishop, Ö. T. *Plasmodium falciparum* Hsp70-x: A Heat Shock Protein at the Host - Parasite Interface Keywords. *Accepted* (2013).
63. Hatherley, R., Blatch, G. L. & Bishop, Ö. T. *Plasmodium falciparum* Hsp70-x: A heat shock protein at the host-parasite interface. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **32**, 1766–1779 (2014).
64. Pei, J., Kim, B. H. & Grishin, N. V. PROMALS3D: A tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2295–2300 (2008).
65. Külzer, S. *et al.* *Plasmodium falciparum* -encoded exported hsp70/hsp40 chaperone/co-chaperone complexes within the host erythrocyte. *Cell. Microbiol.* **14**, 1784–1795 (2012).

66. Assimon, V. a, Gillies, A. T., Rauch, J. N. & Gestwicki, J. E. Hsp70 protein complexes as drug targets. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 404–17 (2013).
67. Charnaud, S. C. *et al.* The exported chaperone Hsp70-x supports virulence functions for Plasmodium falciparum blood stage parasites. *PLoS One* **12**, 1–22 (2017).
68. Stevenson, M. a & Calderwood, S. K. Members of the 70-kilodalton heat shock protein family contain a highly conserved calmodulin-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1234–1238 (1990).
69. Sun, X. T. *et al.* Binding of the maize cytosolic Hsp70 to calmodulin, and identification of calmodulin-binding site in Hsp70. *Plant Cell Physiol.* **41**, 804–810 (2000).
70. Heinen, R. C., Diniz-Mendes, L., Silva, J. T. & Paschoalin, V. M. F. Identification of the divergent calmodulin binding motif in yeast Ssb1/Hsp75 protein and in other HSP70 family members. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **39**, 1399–408 (2006).
71. Vaid, A., Thomas, D. C. & Sharma, P. Role of Ca²⁺/Calmodulin-PfPKB Signaling Pathway in Erythrocyte Invasion by Plasmodium falciparum. *J. Biol. Chem.* **283**, 5589–5597 (2007).
72. Vaid, A. & Sharma, P. PfPKB, a protein kinase B-like enzyme from Plasmodium falciparum: II. Identification of calcium/calmodulin as its upstream activator and dissection of a novel signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **281**, 27126–27133 (2006).
73. Sanders, P. R. *et al.* Identification of protein complexes in detergent-resistant membranes of Plasmodium falciparum schizonts. *Mol. Biochem. Parasitol.* **154**, 148–157 (2007).
74. Das, S., Lemgruber, L., Tay, C. L., Baum, J. & Meissner, M. Multiple essential functions of Plasmodium falciparum actin-1 during malaria blood-stage development. *BMC Biol.* **15**, 1–16 (2017).

75. Kumar, R., Musiyenko, A., Oldenburg, A., Adams, B. & Barik, S. Post-translational generation of constitutively active cores from larger phosphatases in the malaria parasite , *Plasmodium falciparum* : implications for proteomics. *BMC Mol. Biol.* **15**, 1–15 (2004).
76. Yeoh, S. *et al.* Subcellular Discharge of a Serine Protease Mediates Release of Invasive Malaria Parasites from Host Erythrocytes. *Cell* **131**, 1072–1083 (2007).
77. Collins, C. R., Hackett, F., Atid, J., Tan, M. S. Y. & Blackman, M. J. *The Plasmodium falciparum pseudoprotease SERA5 regulates the kinetics and efficiency of malaria parasite egress from host erythrocytes. PLoS Pathogens* **13**, (2017).
78. Mahajan, B. *et al.* Protein disulfide isomerase assisted protein folding in malaria parasites. *Int. J. Parasitol.* **36**, 1037–1048 (2006).

9 ANEXOS

- **Tabela 1.** Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, removidas da Cromatografia de Afinidade à Calmodulina na etapa de lavagem (20 volumes = 10 mL de NaCl 20mM).
- **Tabela 2.** Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**primeira eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).
- **Tabela 3.** Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**segunda eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).
- **Tabela 4.** Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**terceira eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; uréia 8M).
- **Figura 1.** Análise da estrutura primária de PfSub1 (PF3D7_0507500) em busca de possíveis CBDs. A análise foi feita usando o *software Calmodulation Database and Metanalise Predictor* (<http://cam.umassmed.edu>).

Tabela 1. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, removidas da Cromatografia de Afinidade à Calmodulina na etapa de lavagem (20 volumes = 10 mL de NaCl 20mM).

Acesso PlasmDB	Acesso UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Acesso PlasmDB	Acesso UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_1365900	Q8ID50	ubiquitin-60S ribosomal protein L40	2	PF3D7_0831700	K7NTP5	heat shock protein 70	–
PF3D7_1211800	Q7KQK2	polyubiquitin	–	PF3D7_0708400	Q8IC05	heat shock protein 90	–
PF3D7_0702500	Q8IC42	Plasmodium exported protein unknown function	–	PF3D7_0608800	Q6LFH8	ornithine aminotransferase	–
PF3D7_1462800	Q8IKK7	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	–	PF3D7_0626800	C6KTA4	pyruvate kinase	–
PF3D7_1444800	Q7KQL9	fructose-bisphosphate aldolase	–	PF3D7_0922500	P27362	phosphoglycerate kinase	–
PF3D7_1343000	Q8IDQ9	phosphoethanolamine N-methyltransferase	–	PF3D7_0827900	C0H4Y6	protein disulfide isomerase	–
PF3D7_0818200	C0H4V6	14-3-3 protein	–	PF3D7_0917900	Q8I2X4	heat shock protein 70	–
PF3D7_1439900	Q7KQM0	triosephosphate isomerase	–	PF3D7_1446200	Q8IL11	M17 leucyl aminopeptidase	–
PF3D7_1324900	Q76NM3	L-lactate dehydrogenase	–	PF3D7_0922200	Q7K6A4	S-adenosylmethionine synthetase	–
PF3D7_1029600	Q8IJA9	adenosine deaminase	–	PF3D7_1451100	Q8IKW5	elongation factor 2	–
PF3D7_1008900	Q8IJV6	adenylate kinase	–	PF3D7_1468700	Q8IKF0	eukaryotic initiation factor 4A	–
PF3D7_1026800	Q8IJD4	40S ribosomal protein S2	–	PF3D7_1325900	C0H5D6	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1226300	Q8I5F4	haloacid dehalogenase-like hydrolase*	–	PF3D7_0207600	Q9TY95	serine repeat antigen 5	–
PF3D7_1120100	Q8IIG6	phosphoglycerate mutase*	–	PF3D7_0524000	Q8I3M5	karyopherin beta	–
PF3D7_0715800	Q8IBU2	drug/metabolite transporter DMT1*	–	PF3D7_1211800	Q7KQK2	polyubiquitin	–
PF3D7_1015900	Q8IJN7	enolase	–	PF3D7_0302500	O77310	cytoadherence linked asexual protein 3.1	–
PF3D7_0818900	Q8IB24	heat shock protein 70	–	PF3D7_0929400	C0H571	high molecular weight rhoptry protein 2	–
PF3D7_1357100	Q8IOP6	elongation factor 1-alpha	4	PF3D7_1246200	Q8I4X0	actin I	–

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 2. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**primeira eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições
PF3D7_1465900	Q8IKH8	40S ribosomal protein S3	–	PF3D7_0626800	C6KTA4	pyruvate kinase	–
PF3D7_1105000	Q8IIV2	histone H4	–	PF3D7_0207700	O96164	serine repeat antigen 4	–
PF3D7_1357100	Q8I0P6	elongation factor 1-alpha	6	PF3D7_0812400	Q8IAW0	karyopherin alpha	–
PF3D7_1462800	Q8IKK7	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2	PF3D7_1410400	Q8ILZ1	rhopty-associated protein 1	–
PF3D7_0307100	O97249	40S ribosomal protein S12*	–	PF3D7_1408100	Q8IM15	plasmepsin III	–
PF3D7_0309600	O00806	60S acidic ribosomal protein P2	–	PF3D7_0212300	O96203	peptide chain release factor subunit 1*	–
PF3D7_0320900	O97320	histone H2A.Z	–	PF3D7_0827900	C0H4Y6	protein disulfide isomerase	–
PF3D7_1105100	Q8IIV1	histone H2B	–	PF3D7_1244600	Q8I4Y5	GDP-ribosylation factor GTPase-activating protein	–
PF3D7_1006200	Q8IJX8	DNA/RNA-binding protein Alba 3	–	PF3D7_1145400	Q8IHR4	dynammin-like protein	–
PF3D7_0516200	Q8I3U6	40S ribosomal protein S11	–	PF3D7_1446200	Q8IL11	M17 leucyl aminopeptidase	–
PF3D7_0803400	Q8IAN4	DNA repair and recombination protein RAD54*	2	PF3D7_1238800	Q8I535	acyl-CoA synthetase	–
PF3D7_0818900	Q8IB24	heat shock protein 70	2	PF3D7_1035400	Q8IJ55	merozoite surface protein 3	–
PF3D7_0708400	Q8IC05	heat shock protein 90	2	PF3D7_1402300	Q8IM66	26S proteasome regulatory subunit RPN6	–
PF3D7_0917900	Q8I2X4	heat shock protein 70	–	PF3D7_0608800	Q6LFH8	ornithine aminotransferase	–
PF3D7_1311900	Q76NM6	V-type proton ATPase catalytic subunit A	–	PF3D7_1224300	Q8I5H4	polyadenylate-binding protein*	–
PF3D7_1246200	Q8I4X0	actin I	–	PF3D7_0608700	C6KST5	T-complex protein 1 subunit zeta	–
PF3D7_1222300	Q8I0V4	endoplasmin*	–	PF3D7_1444800	Q7KQL9	fructose-bisphosphate aldolase	–

(Continua)

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 2. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**primeira eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).

(Conclusão)

Ac. PlasmoDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições	Ac. PlasmoDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições
PF3D7_1228600	Q8I5D2	merozoite surface protein 9	2	PF3D7_1437900	Q8IL88	HSP40 subfamily A	–
PF3D7_1015900	Q8IJN7	enolase	–	PF3D7_0624600	C6KT82	SNF2 helicase putative	–
PF3D7_0930300	Q8I0U8	merozoite surface protein 1	2	PF3D7_0520900	P50250	adenosylhomocysteinase	–
PF3D7_0207600	Q9TY95	serine repeat antigen 5	2	PF3D7_1130400	Q8II60	26S protease regulatory subunit 6A*	–
PF3D7_1468700	Q8IKF0	eukaryotic initiation factor 4A	–	PF3D7_1417800	Q8ILR7	DNA replication licensing factor MCM2	2
PF3D7_0922200	Q7K6A4	S-adenosylmethionine synthetase	–	PF3D7_1138500	Q8IHY0	protein phosphatase PPM2	–
PF3D7_1451100	Q8IKW5	elongation factor 2	–	PF3D7_0708800	Q8IC01	heat shock protein 110	–
PF3D7_1134000	Q8II24	heat shock protein 70	–	PF3D7_0800300	Q8IAK3	erythrocyte membrane protein 1 PfEMP1	–
PF3D7_1248900	Q8I4U5	26S protease regulatory subunit 8*	–	PF3D7_1219600	Q8I5L4	aminophospholipid-transporting P-ATPase	–
PF3D7_1365900	Q8ID50	ubiquitin-60S ribosomal protein L40	2	PF3D7_0920800	Q8I2U5	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	–
PF3D7_1211800	Q7KQK2	polyubiquitin	2	PF3D7_1443900	Q8IL32	heat shock protein 90	–
PF3D7_1008700	Q7KQL5	tubulin beta chain	–	PF3D7_0929400	C0H571	high molecular weight rhopty protein 2	–
PF3D7_1008400	Q8IJW0	26S protease regulatory subunit 4*	–	PF3D7_0524000	Q8I3M5	karyopherin beta	–
PF3D7_0922500	P27362	phosphoglycerate kinase	–	PF3D7_1466300	Q8IKH3	26S proteasome regulatory subunit RPN2*	–
PF3D7_0903700	Q6ZLZ9	alpha tubulin 1	–				

Fontes: PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 3. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**segunda eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).

Ac. PlasmoDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmoDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_1462800	Q8IKK7	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4	PF3D7_1146600	Q8IHQ2	oocyst rupture protein 1*	–
PF3D7_0309600	O00806	60S acidic ribosomal protein P2	2	PF3D7_0110500	Q8I240	bromodomain protein*	–
PF3D7_1308300	Q8IEN2	40S ribosomal protein S27	2	PF3D7_1105800	Q8IIU5	conserved Apicomplexan protein unknown function	–
PF3D7_1434200	P62203	calmodulin	–	PF3D7_1309100	Q8IEM3	60S ribosomal protein L24*	–
PF3D7_0516200	Q8I3U6	40S ribosomal protein S11	–	PF3D7_1434800	Q8ILB6	mitochondrial acidic protein MAM33 putative	–
PF3D7_0307100	O97249	40S ribosomal protein S12*	–	PF3D7_1020900	Q7KQL3	ADP-ribosylation factor	–
PF3D7_0922200	Q7K6A4	S-adenosylmethionine synthetase	3	PF3D7_0807800	Q8IAR6	26S proteasome regulatory subunit RPN10*	–
PF3D7_1243600	Q8I4Z4	translation initiation factor SU11 putative	–	PF3D7_0415000	Q8I1T8	arsenical pump-driving ATPase*	–
PF3D7_0613800	C6KSY0	AP2 domain transcription factor*	–	PF3D7_1414300	Q8ILV2	60S ribosomal protein L10*	–
PF3D7_1465900	Q8IKH8	40S ribosomal protein S3	4	PF3D7_0813400	C0H4U5	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1248900	Q8I4U5	26S protease regulatory subunit 8*	3	PF3D7_1423700	Q8ILL5	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0207600	Q9TY95	serine repeat antigen 5	4	PF3D7_0727400	Q8IBI3	proteasome subunit alpha type-5*	–
PF3D7_1135400	Q8II11	conserved Plasmodium protein unknown function	2	PF3D7_1364800	Q8ID59	DNA-directed RNA polymerases I II and III subunit RPABC1*	–
PF3D7_1246200	Q8I4X0	actin I	3	PF3D7_0907700	Q8I374	proteasome activator 28 subunit beta*	–
PF3D7_0702400	Q8IC43	small exported membrane protein 1	2	PF3D7_1004000	Q8IJZ7	60S ribosomal protein L13*	–
PF3D7_1006200	Q8IJX8	DNA/RNA-binding protein Alba 3	–	PF3D7_1302800	Q8IET7	40S ribosomal protein S7*	–
PF3D7_1421500	Q8ILN5	mitochondrial import inner membrane translocase sub. TIM8*	–	PF3D7_1203700	Q8I608	nucleosome assembly*	2

(Continua)

Fontes: PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 3. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**segunda eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).

(Continuação)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_1331800	Q8IE09	60S ribosomal protein L23*	3	PF3D7_1133800	Q8II27	RNA (uracil-5-)-methyltransferase*	–
PF3D7_1216900	Q8I5N9	DNA-binding chaperone*	–	PF3D7_1116700	Q8IIJ9	dipeptidyl aminopeptidase 1	–
PF3D7_0903700	Q6ZLZ9	alpha tubulin 1	3	PF3D7_0413600	Q8I1V1	26S protease regulatory subunit 6B*	2
PF3D7_0422300	Q8IFP3	alpha tubulin 2	2	PF3D7_1027700	Q8IJC7	centrin-3	2
PF3D7_1242700	Q8I502	40S ribosomal protein S17*	2	PF3D7_0109200	Q8I0V9	cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5*	–
PF3D7_0708400	Q8IC05	heat shock protein 90	4	PF3D7_0919000	Q8I2W3	nucleosome assembly protein	–
PF3D7_0814200	Q8IAX8	DNA/RNA-binding protein Alba 1	3	PF3D7_1466300	Q8IKH3	26S proteasome regulatory subunit RPN2*	2
PF3D7_1130200	Q8II61	60S ribosomal protein P0	2	PF3D7_0320900	O97320	histone H2A.Z	–
PF3D7_0617800	C6KT18	histone H2A	2	PF3D7_0311300	O77353	phosphatidylinositol 3- and 4-kinase*	–
PF3D7_1306400	Q8IEQ1	26S protease regulatory subunit 10B*	3	PF3D7_1031800	Q8IJ87	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0406700	C0H492	conserved Plasmodium protein unknown function	–	PF3D7_1345900	C0H5H5	kinetochore protein SPC25*	–
PF3D7_1365900	Q8ID50	ubiquitin-60S ribosomal protein L40	4	PF3D7_1027300	Q8IJD0	peroxiredoxin	–
PF3D7_1228600	Q8I5D2	merozoite surface protein 9	4	PF3D7_1317800	C0H5C2	40S ribosomal protein S19	–
PF3D7_0922500	P27362	phosphoglycerate kinase	3	PF3D7_0800300	Q8IAK3	erythrocyte membrane protein 1 PfEMP1	–
PF3D7_1461300	Q8IKL9	40S ribosomal protein S28e*	–	PF3D7_1219600	Q8I5L4	aminophospholipid-transporting P-ATPase	–
PF3D7_1008700	Q7KQL5	tubulin beta chain	3	PF3D7_1428100	Q8ILI4	WW domain-binding protein 11*	–
PF3D7_1407500	Q8IM19	multifunctional methyltransferase subunit TRM112*	–	PF3D7_0621200	C6KT50	pyridoxine biosynthesis protein PDX1	–

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 3. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**segunda eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).

(Continuação)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_0306900	O97248	40S ribosomal protein S23*	2	PF3D7_1006800	Q8IJX3	single-strand telomeric DNA-binding protein GBP2*	–
PF3D7_1436000	Q8ILA4	glucose-6-phosphate isomerase	–	PF3D7_1328500	Q8IE45	alpha/beta-hydrolase*	–
PF3D7_1446200	Q8IL11	M17 leucyl aminopeptidase	2	PF3D7_1105000	Q8IIV2	histone H4	2
PF3D7_1130100	Q8II62	60S ribosomal protein L38	–	PF3D7_1118200	Q8III6	heat shock protein 90*	2
PF3D7_1225700	Q8I5G0	VAC14 domain-containing protein*	–	PF3D7_0829100	C0H4Y8	conserved protein unknown function	–
PF3D7_0624600	C6KT82	SNF2 helicase*	4	PF3D7_0512600	Q7K6A8	ras-related protein Rab-1B	–
PF3D7_1007700	Q8IJW6	AP2 domain transcription factor AP2-I	3	PF3D7_1342000	Q8IDR9	40S ribosomal protein S6	–
PF3D7_1126200	Q8IIA2	40S ribosomal protein S18*	2	PF3D7_0617200	C6KT13	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1144000	Q8IHS5	40S ribosomal protein S21	–	PF3D7_0418500	Q8I1Q2	trafficking protein particle complex subunit 3*	–
PF3D7_0422400	Q8IFP2	40S ribosomal protein S19	2	PF3D7_1409300	Q8IM03	DNA damage-inducible protein 1*	–
PF3D7_0702500	Q8IC42	Plasmodium exported protein unknown function	–	PF3D7_1212400	Q8I5S8	tetratricopeptide repeat protein*	–
PF3D7_0815600	Q8IAZ3	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G*	–	PF3D7_1123500	Q8IIC8	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1441200	Q8IL58	60S ribosomal protein L1*	2	PF3D7_0530900	Q8I3F9	formin 1	2
PF3D7_1003500	Q8IK02	40S ribosomal protein S20e*	2	PF3D7_1111200	Q8IIQ0	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0813900	Q8IAX5	40S ribosomal protein S16*	2	PF3D7_1424400	Q8ILL2	60S ribosomal protein L7-3*	–
PF3D7_0813100	Q8IAW6	conserved Plasmodium protein unknown function	–	PF3D7_1477200	Q8IK63	Plasmodium exported protein (hyp15) unknown function	–
PF3D7_1108600	Q8IIR7	endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein	2	PF3D7_1008800	Q8IJV7	nucleolar protein 5*	–

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 3. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**segunda eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).

(Continuação)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_0719700	Q8IBQ5	40S ribosomal protein S10*	2	PF3D7_1006700	Q8IJX4	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0519400	Q8I3R6	40S ribosomal protein S24	–	PF3D7_1313900	C0H5B4	ankyrin-repeat protein*	–
PF3D7_0618300	C6KT23	60S ribosomal protein L27a*	–	PF3D7_1357400	Q8IDD1	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1408100	Q8IM15	plasmepsin III	3	PF3D7_1427300	Q8ILJ1	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1407900	Q7KQM4	plasmepsin I	2	PF3D7_0831000	Q8IBD6	Plasmodium exported protein (PHISTb) unknown function	–
PF3D7_0525100	Q8I3L4	acyl-CoA synthetase	2	PF3D7_1236100	Q8I562	clustered-asparagine-rich protein	–
PF3D7_1407800	Q8IM16	plasmepsin IV	–	PF3D7_0917900	Q8I2X4	heat shock protein 70	–
PF3D7_1008900	Q8IJV6	adenylate kinase	–	PF3D7_1222300	Q8I0V4	endoplasmic*	2
PF3D7_1035400	Q8IJ55	merozoite surface protein 3	2	PF3D7_1437900	Q8IL88	HSP40 subfamily A	–
PF3D7_1324900	Q76NM3	L-lactate dehydrogenase	2	PF3D7_1362200	Q8ID85	RuvB-like helicase 3	2
PF3D7_1311900	Q76NM6	V-type proton ATPase catalytic subunit A	3	PF3D7_1008400	Q8IJW0	26S protease regulatory subunit 4*	–
PF3D7_1408000	Q8I6V3	plasmepsin II	–	PF3D7_1134000	Q8II24	heat shock protein 70	–
PF3D7_1408600	Q8IM10	40S ribosomal protein S8e*	–	PF3D7_0907400	Q8I377	ATP-dependent protease ATPase subunit ClpY	–
PF3D7_0818200	C0H4V6	14-3-3 protein	–	PF3D7_0915400	Q8I2Z8	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	–
PF3D7_0501600	Q8I484	rhopty-associated protein 2	–	PF3D7_1015900	Q8IJN7	enolase	–
PF3D7_1353900	Q8IDG2	proteasome subunit alpha type-7*	–	PF3D7_0802800	Q8IAM8	serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit A	–
PF3D7_1244600	Q8I4Y5	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein	2	PF3D7_1145400	Q8IHR4	dynamamin-like protein	–

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 3. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**segunda eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).

(Continuação)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_0322900	O97313	40S ribosomal protein S3A*	–	PF3D7_1410400	Q8ILZ1	rho-try-associated protein 1	–
PF3D7_1216200	Q8I5P5	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] putative	–	PF3D7_1235600	Q8I566	serine hydroxymethyltransferase	–
PF3D7_1302000	Q8IEI6	EMP1-trafficking protein	2	PF3D7_0610800	C6KSV3	transketolase	–
PF3D7_1357100	Q8I0P6	elongation factor 1-alpha	6	PF3D7_1104200	Q8IIW0	chromatin remodeling protein	2
PF3D7_1010600	Q8IJT9	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta	–	PF3D7_0626800	C6KTA4	pyruvate kinase	–
PF3D7_1325100	Q8IE67	phosphoribosylpyrophosphate synthetase	–	PF3D7_1343700	Q8IDQ2	kelch protein K13	–
PF3D7_0618200	C6KT22	conserved Plasmodium protein unknown function	–	PF3D7_0608800	Q6LFH8	ornithine aminotransferase	–
PF3D7_1033200	Q8IJ76	early transcribed membrane protein 10.2	–	PF3D7_0827900	C0H4Y6	protein disulfide isomerase	–
PF3D7_1468700	Q8IKF0	eukaryotic initiation factor 4A	2	PF3D7_0708800	Q8IC01	heat shock protein 110	–
PF3D7_1368100	Q8ID28	26S proteasome regulatory subunit RPN118*	–	PF3D7_1437200	Q8IL94	ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit*	–
PF3D7_1340700	C0H5G2	ras-related protein Rab-11B	–	PF3D7_1238800	Q8I535	acyl-CoA synthetase	–
PF3D7_0413700	Q8I1V0	lysine decarboxylase-like protein*	–	PF3D7_0418200	Q8I1Q5	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M*	–
PF3D7_1424100	Q8ILL3	60S ribosomal protein L5*	–	PF3D7_0205900	O96153	26S proteasome regulatory subunit RPN1*	–
PF3D7_0517000	Q8I3T8	60S ribosomal protein L12*	–	PF3D7_1229500	Q8I5C4	T-complex protein 1 subunit gamma	–
PF3D7_0317600	O77381	40S ribosomal protein S11*	–	PF3D7_1338100	Q8IDV2	26S proteasome regulatory subunit RPN3*	–
PF3D7_0934500	Q8I2H3	V-type proton ATPase subunit E*	–	PF3D7_1402300	Q8IM66	26S proteasome regulatory subunit RPN6	–
PF3D7_1138500	Q8IHY0	protein phosphatase PPM2	2	PF3D7_1417800	Q8ILR7	DNA replication licensing factor MCM2	2

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 3. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**segunda eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).

(Continuação)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_1127600	Q8II87	CRAL/TRIO domain-containing protein*	–	PF3D7_1149000	Q8IHN4	antigen 332 DBL-like protein	2
PF3D7_0807900	Q8IAR7	tyrosine--tRNA ligase	2	PF3D7_1200700	Q8I638	acyl-CoA synthetase	–
PF3D7_1335100	Q8IDX8	merozoite surface protein 7	–	PF3D7_0608700	C6KST5	T-complex protein 1 subunit zeta	–
PF3D7_0826700	Q8IBA0	receptor for activated c kinase	–	PF3D7_0209100	O96176	phospholipase A2*	–
PF3D7_1412500	Q8ILW9	actin II	2	PF3D7_0206800	P50498	merozoite surface protein 2	–
PF3D7_1343000	Q8IDQ9	phosphoethanolamine N-methyltransferase	2	PF3D7_0527200	Q8I3J3	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	–
PF3D7_0404900	Q8I1Y0	6-cysteine protein	–	PF3D7_0209800	Q9TY94	ATP-dependent RNA helicase UAP56	–
PF3D7_1358800	Q8IDB0	40S ribosomal protein S15	–	PF3D7_1454400	Q8IKT5	aminopeptidase P	–
PF3D7_1129200	Q8II71	26S proteasome regulatory subunit RPN7*	2	PF3D7_1230700	Q8I5B3	protein transport protein SEC13	–
PF3D7_0721600	Q8IBN5	40S ribosomal protein S5*	–	PF3D7_0611400	C6KSV9	SWIB/MDM2 domain-containing protein	–
PF3D7_0416800	Q8I1S0	small GTP-binding protein sar1	–	PF3D7_1224300	Q8I5H4	polyadenylate-binding protein*	–
PF3D7_1244800	Q8I4Y3	cytoplasmic translation machinery associated protein*	–	PF3D7_0812400	Q8IAW0	karyopherin alpha	–
PF3D7_0212300	O96203	peptide chain release factor subunit 1*	2	PF3D7_1357800	C0H5I7	T-complex protein 1 subunit delta	–
PF3D7_1354300	Q8IDF8	large subunit rRNA methyltransferase*	2	PF3D7_1004300	Q8IJZ4	E3 ubiquitin-protein ligase*	–
PF3D7_0721100	Q8IBP0	conserved Plasmodium protein unknown function	–	PF3D7_1316600	Q8IEE9	choline-phosphate cytidyltransferase	–
PF3D7_1311500	Q8IEK3	26S protease regulatory subunit 7*	2	PF3D7_1132200	Q8II43	T-complex protein 1 subunit alpha	–
PF3D7_0930300	Q8IOU8	merozoite surface protein 1	3	PF3D7_1343900	C0H5G7	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein PRP4*	–

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 3. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**segunda eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).

(Continuação)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_1211800	Q7KQK2	polyubiquitin	3	PF3D7_0500800	Q8I492	mature parasite-infected erythrocyte surface antigen	–
PF3D7_1026800	Q8IJD4	40S ribosomal protein S2	–	PF3D7_0217500	P62344	calcium-dependent protein kinase 1	–
PF3D7_1357900	Q8IDC6	pyrroline-5-carboxylate reductase*	–	PF3D7_1103600	Q8IIW6	actin-like protein*	–
PF3D7_1444800	Q7KQL9	fructose-bisphosphate aldolase	–	PF3D7_1021900	Q8IJI4	PHAX domain-containing protein*	–
PF3D7_1035500	Q8IJ54	merozoite surface protein 6	–	PF3D7_1225200	Q8I5G5	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1426100	Q8ILK2	transcription factor BTF3*	–	PF3D7_1106000	Q8IIU3	RuvB-like helicase 2	–
PF3D7_0107000	Q8I272	centrin-1	–	PF3D7_0309500	O77330	asparagine synthetase*	–
PF3D7_1404900	Q8IM45	conserved Plasmodium protein unknown function	–	PF3D7_0811000	Q8IAU5	cullin-1*	–
PF3D7_0912900	Q8I323	26S proteasome regulatory subunit RPN8*	–	PF3D7_1129100	Q8II72	parasitophorous vacuolar protein 1	–
PF3D7_1350100	Q8IDJ8	lysine--tRNA ligase	–	PF3D7_0207500	Q9TY96	serine repeat antigen 6	–
PF3D7_1130400	Q8II60	26S protease regulatory subunit 6A*	2	PF3D7_1021800	Q8IJI5	schizont egress antigen-1	–
PF3D7_0924700	Q8I2R0	splicing factor 3A subunit 3*	–	PF3D7_1457500	Q8IKQ5	vacuolar protein sorting-associated protein 4	–
PF3D7_1030500	Q8IJA0	26S proteasome regulatory subunit RPN9*	–	PF3D7_0306800	O97247	T-complex protein 1 subunit beta	–
PF3D7_0621800	C6KT55	nascent polypeptide-associated complex sub. Alpha*	–	PF3D7_0619400	C6KT34	cell division cycle protein 48 homologue*	–
PF3D7_0310400	O77361	parasite-infected erythrocyte surface protein	2	PF3D7_0520900	P50250	adenosylhomocysteinase	–
PF3D7_0925900	Q8I2Q0	conserved Plasmodium protein unknown function	–	PF3D7_0526600	Q8I3J9	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1239200	Q8I531	AP2 domain transcription factor*	–	PF3D7_0505200	Q8I450	actin-like protein*	–

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 3. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**segunda eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).

(Continuação)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_0207700	O96164	serine repeat antigen 4	2	PF3D7_0308200	O77323	T-complex protein 1 subunit eta	–
PF3D7_0705400	Q8IC16	DNA replication licensing factor MCM7	2	PF3D7_1206700	Q8I5X8	eukaryotic translation initiation factor 5*	–
PF3D7_0831700	K7NTP5	heat shock protein 70	2	PF3D7_1338300	Q8IDV0	elongation factor 1-gamma*	–
PF3D7_0818900	Q8IB24	heat shock protein 70	3	PF3D7_0202400	O96127	translation-enhancing factor	–
PF3D7_1463200	Q8IKK4	replication factor C subunit 3*	2	PF3D7_1332700	Q8IE01	ATP-dependent RNA helicase DBP8*	–
PF3D7_1471100	Q8IKC8	exported protein 2	–	PF3D7_1225100	Q8I5G6	isoleucine--tRNA ligase*	–
PF3D7_1449500	Q8IKY0	AP2 domain transcription factor*	–	PF3D7_1419700	Q8ILQ3	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0301700	O97336	Plasmodium exported protein unknown function	–	PF3D7_1014100	Q8IJQ4	merozoite surface protein MSA180*	–
PF3D7_0723400	Q8IBL9	conserved Plasmodium protein unknown function	–	PF3D7_1355100	Q8IDF0	DNA replication licensing factor MCM6	–
PF3D7_1451100	Q8IKW5	elongation factor 2	2	PF3D7_1346400	C0H5H6	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1205600	Q8I5Y9	tetratricopeptide repeat protein*	–	PF3D7_0524000	Q8I3M5	karyopherin beta	–
PF3D7_1451700	Q8IKV9	calcineurin subunit B	–	PF3D7_1331700	Q8IE10	glutamine--tRNA ligase*	–
PF3D7_1241700	Q8I512	replication factor C subunit 4*	–	PF3D7_0622800	C6KT64	leucine--tRNA ligase*	–
PF3D7_0520000	Q8I3R0	40S ribosomal protein S9*	–	PF3D7_1317100	Q8IEE5	DNA replication licensing factor MCM4	–
PF3D7_0719600	Q8IBQ6	60S ribosomal protein L11a*	–	PF3D7_0302500	O77310	cytoadherence linked asexual protein 3.1	–
PF3D7_0214100	O96221	protein transport protein SEC31	2	PF3D7_1219100	Q8I5L6	clathrin heavy chain*	–
PF3D7_0312300	O77345	26S proteasome regulatory subunit RPN12*	–	PF3D7_0706000	C0H4L1	importin-7*	–

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 3. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**segunda eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; EGTA 2mM, NaCl 100mM).

(Conclusão)

Ac. PlasmoDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmoDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_1367000	Q8ID38	suppressor of kinetochore protein 1*	–	PF3D7_1468100	Q8IKF6	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1442000	Q8IL50	ADP-ribosylation factor*	–	PF3D7_0929400	C0H571	high molecular weight rhopty protein 2	–
PF3D7_1105400	Q8IIU8	40S ribosomal protein S4*	–	PF3D7_1360800	Q76NL8	falcilysin	–
PF3D7_0218000	O96260	replication factor C subunit 2*	–	PF3D7_1121100	Q8IIF6	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0303200	O77317	HAD superfamily protein*	–	PF3D7_0105600	Q8I285	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1012400	Q8IJS1	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	–				

Fontes: PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 4. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**terceira eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; uréia 8M).

(Continua)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_1246200	Q8I4X0	actin I	2	PF3D7_1410600	Q8ILY9	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma*	–
PF3D7_0818900	Q8IB24	heat shock protein 70	2	PF3D7_0310400	O77361	parasite-infected erythrocyte surface protein	2
PF3D7_1357100	Q8I0P6	elongation factor 1-alpha	2	PF3D7_0209100	O96176	phospholipase A2 putative	–
PF3D7_1357000	Q8I0P6	elongation factor 1-alpha	2	PF3D7_0610800	C6KSV3	transketolase	–
PF3D7_1437900	Q8IL88	HSP40 subfamily A	2	PF3D7_0803700	Q8IAN7	tubulin gamma chain	–
PF3D7_0930300	Q8I0U8	merozoite surface protein 1	2	PF3D7_1454400	Q8IKT5	aminopeptidase P	–
PF3D7_0917900	Q8I2X4	heat shock protein 70	–	PF3D7_1410400	Q8ILZ1	rho-try-associated protein 1	–
PF3D7_1228600	Q8I5D2	merozoite surface protein 9	2	PF3D7_1118200	Q8III6	heat shock protein 90*	–
PF3D7_0915400	Q8I2Z8	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	2	PF3D7_0826100	Q8IB94	HECT-like E3 ubiquitin ligase*	–
PF3D7_0708400	Q8IC05	heat shock protein 90	2	PF3D7_0321100	O97287	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0705400	Q8IC16	DNA replication licensing factor MCM7	2	PF3D7_1438700	Q7KQM1	DNA primase small subunit	–
PF3D7_1222300	Q8I0V4	endoplasmic*	2	PF3D7_1145100	Q8IHR6	coatomer subunit gamma putative	2
PF3D7_1008700	Q7KQL5	tubulin beta chain	2	PF3D7_0322900	O97313	40S ribosomal protein S3A putative	–
PF3D7_1362200	Q8ID85	RuvB-like helicase 3	2	PF3D7_1331800	Q8IE09	60S ribosomal protein L23 putative	–
PF3D7_1468700	Q8IKF0	eukaryotic initiation factor 4A	2	PF3D7_1412100	Q8ILX3	mini-chromosome maintenance complex-binding protein*	2
PF3D7_1248900	Q8I4U5	26S protease regulatory subunit 8*	–	PF3D7_0611400	C6KSV9	SWIB/MDM2 domain-containing protein	–
PF3D7_0920800	Q8I2U5	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	–	PF3D7_0624000	C6KT76	hexokinase	–

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 4. (continuação). Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**terceira eluição**: 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; uréia 8M).

(Continuação)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_1412500	Q8ILW9	actin II	–	PF3D7_0905400	Q8I395	high molecular weight rhopty protein 3	–
PF3D7_0525100	Q8I3L4	acyl-CoA synthetase	2	PF3D7_1244600	Q8I4Y5	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein	–
PF3D7_1238800	Q8I535	acyl-CoA synthetase	2	PF3D7_1466300	Q8IKH3	26S proteasome regulatory subunit RPN2*	2
PF3D7_0212300	O96203	peptide chain release factor subunit 1*	–	PF3D7_1208900	Q8I5V9	protein phosphatase PPM11*	–
PF3D7_1129100	Q8II72	parasitophorous vacuolar protein 1	–	PF3D7_1408600	Q8IM10	40S ribosomal protein S8e*	–
PF3D7_0626800	C6KTA4	pyruvate kinase	–	PF3D7_0822600	Q8IB60	protein transport protein SEC23	–
PF3D7_1008400	Q8IJW0	26S protease regulatory subunit 4*	–	PF3D7_1343000	Q8IDQ9	phosphoethanolamine N-methyltransferase	–
PF3D7_0922200	Q7K6A4	S-adenosylmethionine synthetase	–	PF3D7_1121700	Q8IIE9	protein GCN20	–
PF3D7_0831700	K7NTP5	heat shock protein 70	–	PF3D7_0507100	Q8I431	60S ribosomal protein L4	–
PF3D7_1338100	Q8IDV2	26S proteasome regulatory subunit RPN3*	2	PF3D7_1347500	Q8IDM3	DNA/RNA-binding protein Alba 4	–
PF3D7_1106000	Q8IIU3	RuvB-like helicase 2	–	PF3D7_0616200	C6KT03	kinetochore protein NDC80*	–
PF3D7_1306400	Q8IEQ1	26S protease regulatory subunit 10B*	–	PF3D7_1466800	Q8IKG9	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0413600	Q8I1V1	26S protease regulatory subunit 6B*	–	PF3D7_1239800	Q8I525	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1224300	Q8I5H4	polyadenylate-binding protein*	2	PF3D7_1437200	Q8IL94	ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit*	2
PF3D7_1462800	Q8IKK7	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2	PF3D7_1338300	Q8IDV0	elongation factor 1-gamma*	–
PF3D7_1355100	Q8IDF0	DNA replication licensing factor MCM6	2	PF3D7_0320800	O97285	ATP-dependent RNA helicase DDX6	–
PF3D7_0207600	Q9TY95	serine repeat antigen 5	2	PF3D7_0814200	Q8IAX8	DNA/RNA-binding protein Alba 1	–

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 4. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**terceira eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; uréia 8M).

(Continuação)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_1417800	Q8ILR7	DNA replication licensing factor MCM2	2	PF3D7_0317600	O77381	40S ribosomal protein S11*	2
PF3D7_1017900	Q8IJM0	26S proteasome regulatory subunit p55*	–	PF3D7_1104200	Q8IIW0	chromatin remodeling protein	2
PF3D7_0214100	O96221	protein transport protein SEC31	–	PF3D7_1007700	Q8IJW6	AP2 domain transcription factor AP2-I	–
PF3D7_1129200	Q8II71	26S proteasome regulatory subunit RPN7*	–	PF3D7_1212700	Q8I5S6	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A*	2
PF3D7_1229500	Q8I5C4	T-complex protein 1 subunit gamma	–	PF3D7_1316600	Q8IEE9	choline-phosphate cytidyltransferase	2
PF3D7_0205900	O96153	26S proteasome regulatory subunit RPN1*	2	PF3D7_1235600	Q8I566	serine hydroxymethyltransferase	–
PF3D7_1130400	Q8II60	26S protease regulatory subunit 6A*	–	PF3D7_0209800	Q9TY94	ATP-dependent RNA helicase UAP56	–
PF3D7_1138500	Q8IHY0	protein phosphatase PPM2	–	PF3D7_0617800	C6KT18	histone H2A	–
PF3D7_1451100	Q8IKW5	elongation factor 2	2	PF3D7_0320900	O97320	histone H2A.Z	–
PF3D7_0903700	Q6ZLZ9	alpha tubulin 1	–	PF3D7_1419400	Q8ILQ6	conserved Plasmodium membrane protein unknown function	–
PF3D7_0608700	C6KST5	T-complex protein 1 subunit zeta	–	PF3D7_1232100	Q8I0V3	60 kDa chaperonin	–
PF3D7_1211700	Q8I5T4	DNA replication licensing factor MCM5*	–	PF3D7_0316500	O77390	kinetochore protein NUF2*	–
PF3D7_1357800	C0H5I7	T-complex protein 1 subunit delta	–	PF3D7_1456700	Q8IKR2	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1311900	Q76NM6	V-type proton ATPase catalytic subunit A	2	PF3D7_1200700	Q8I638	acyl-CoA synthetase	–
PF3D7_0619400	C6KT34	cell division cycle protein 48 homologue*	2	PF3D7_0302200	O77309	cytoadherence linked asexual protein 3.2	2
PF3D7_1365900	Q8ID50	ubiquitin-60S ribosomal protein L40	2	PF3D7_0302500	O77310	cytoadherence linked asexual protein 3.1	2
PF3D7_1211800	Q7KQK2	polyubiquitin	2	PF3D7_1424100	Q8ILL3	60S ribosomal protein L5*	–

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 4. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**terceira eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; uréia 8M).

(Continuação)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_1311500	Q8IEK3	26S protease regulatory subunit 7*	–	PF3D7_1361100	C0H5J6	protein transport protein Sec24A	–
PF3D7_1402300	Q8IM66	26S proteasome regulatory subunit RPN6	–	PF3D7_1471400	Q8IKC5	diacylglycerol kinase*	–
PF3D7_1015900	Q8IJN7	enolase	–	PF3D7_1416500	Q8ILT0	NADP-specific glutamate dehydrogenase	–
PF3D7_0320300	O97282	T-complex protein 1 subunit epsilon	–	PF3D7_0929400	C0H571	high molecular weight rho-try protein 2	2
PF3D7_0608800	Q6LFH8	ornithine aminotransferase	–	PF3D7_1342000	Q8IDR9	40S ribosomal protein S6	–
PF3D7_0708800	Q8IC01	heat shock protein 110	2	PF3D7_1326600	C0H5D9	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0207700	O96164	serine repeat antigen 4	–	PF3D7_1205600	Q8I5Y9	tetratricopeptide repeat protein*	–
PF3D7_1230700	Q8I5B3	protein transport protein SEC13	–	PF3D7_0308600	O77325	pre-mRNA-processing factor 19*	–
PF3D7_1216900	Q8I5N9	DNA-binding chaperone*	–	PF3D7_0613800	C6KSY0	AP2 domain transcription factor*	–
PF3D7_0629200	C6KTC7	DnaJ protein*	–	PF3D7_0511800	Q8I3Y8	inositol-3-phosphate synthase	–
PF3D7_0802000	Q8IAM0	glutamate dehydrogenase*	2	PF3D7_1134100	Q8II23	protein disulfide isomerase	–
PF3D7_0505200	Q8I450	actin-like protein*	–	PF3D7_1016400	Q8IJN3	serine/threonine protein kinase FIKK family	–
PF3D7_1134000	Q8II24	heat shock protein 70	–	PF3D7_1146000	Q8IHQ8	ribosome assembly protein 4*	–
PF3D7_0418200	Q8I1Q5	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M*	–	PF3D7_0530900	Q8I3F9	formin 1	2
PF3D7_0214000	O96220	T-complex protein 1 subunit theta	–	PF3D7_0813400	C0H4U5	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1132200	Q8II43	T-complex protein 1 subunit alpha	–	PF3D7_0917600	Q8I2X7	pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP43*	–
PF3D7_0612100	C6KSW5	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L*	–	PF3D7_0811600	Q8IAV1	conserved Plasmodium protein unknown function	2

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 4. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**terceira eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; uréia 8M).

(Continuação)

Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_0827900	C0H4Y6	protein disulfide isomerase	–	PF3D7_1420100	Q8ILP9	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0308200	O77323	T-complex protein 1 subunit eta	–	PF3D7_1035400	Q8IJ55	merozoite surface protein 3	–
PF3D7_0807900	Q8IAR7	tyrosine--tRNA ligase	–	PF3D7_0413700	Q8I1V0	lysine decarboxylase-like protein*	–
PF3D7_1317100	Q8IEE5	DNA replication licensing factor MCM4	2	PF3D7_1014100	Q8IJQ4	merozoite surface protein MSA180*	–
PF3D7_0517700	Q8I3T1	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B*	–	PF3D7_0813300	C0H4U4	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1408100	Q8IM15	plasmepsin III	–	PF3D7_1430600	Q8ILF8	exodeoxyribonuclease III*	–
PF3D7_0617200	C6KT13	conserved Plasmodium protein unknown function	–	PF3D7_0410900	Q9U0H9	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1145400	Q8IHR4	dynammin-like protein	–	PF3D7_0524000	Q8I3M5	karyopherin beta	–
PF3D7_0907400	Q8I377	ATP-dependent protease ATPase subunit ClpY	–	PF3D7_1468100	Q8IKF6	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0812400	Q8IAW0	karyopherin alpha	–	PF3D7_1003800	Q8IJZ9	U5 small nuclear ribonucleoprotein component*	–
PF3D7_0306800	O97247	T-complex protein 1 subunit beta	–	PF3D7_1219100	Q8I5L6	clathrin heavy chain*	–
PF3D7_0528200	Q8I3I5	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E*	–	PF3D7_0622800	C6KT64	leucine--tRNA ligase*	–
PF3D7_0624600	C6KT82	SNF2 helicase putative	2	PF3D7_0215700	O96236	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2*	–
PF3D7_0807800	Q8IAR6	26S proteasome regulatory subunit RPN10*	–	PF3D7_1426700	Q8ILJ7	phosphoenolpyruvate carboxylase	–
PF3D7_0219600	O96271	replication factor C subunit 1*	–	PF3D7_1360800	Q76NL8	falcilysin	–
PF3D7_1419700	Q8ILQ3	conserved Plasmodium protein unknown function	–	PF3D7_1252100	Q8I4R5	rhoptry neck protein 3	–
PF3D7_0520900	P50250	adenosylhomocysteinase	–	PF3D7_1442900	Q8IL42	protein transport protein SEC7*	–

Fontes: PlasmDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 4. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**terceira eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; uréia 8M).

(Continuação)

Ac. PlasmoDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmoDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_1103600	Q8IIW6	actin-like protein*	–	PF3D7_1429800	Q8ILG6	coatamer subunit beta*	–
PF3D7_0207500	Q9TY96	serine repeat antigen 6	–	PF3D7_0619500	C6KT35	acyl-CoA synthetase	–
PF3D7_1011800	Q8IJS7	PRE-binding protein	2	PF3D7_1128000	Q8II83	conserved Plasmodium protein unknown function	2
PF3D7_0905900	Q8I390	coatamer subunit beta*	2	PF3D7_0606700	C6KSR5	coatamer alpha subunit*	–
PF3D7_0922500	P27362	phosphoglycerate kinase	2	PF3D7_1225200	Q8I5G5	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0801000	Q8IAK9	Plasmodium exported protein (PHISTc) unknown function	–	PF3D7_0935800	Q8I2G2	cytoadherence linked asexual protein 9	–
PF3D7_0910100	C0H530	exportin-7*	–	PF3D7_1445100	Q8IL22	histidine--tRNA ligase*	–
PF3D7_0527500	Q8I3J0	Hsc70-interacting protein	–	PF3D7_1218500	Q8I5M3	dynammin-like protein*	–
PF3D7_1445900	Q8IL13	ATP-dependent RNA helicase DDX5*	–	PF3D7_0703500	Q8IC35	erythrocyte membrane-associated antigen	–
PF3D7_0309500	O77330	asparagine synthetase*	–	PF3D7_1464600	Q8IKJ1	serine/threonine protein phosphatase UIS2*	–
PF3D7_1329100	Q8IE50	myosin F*	2	PF3D7_0627700	C6KTB3	transportin	–
PF3D7_1331700	Q8IE10	glutamine--tRNA ligase*	2	PF3D7_1234800	Q8I574	splicing factor 3B subunit 3 putative	–
PF3D7_1015600	Q8IJN9	heat shock protein 60	–	PF3D7_0318200	O77375	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	–
PF3D7_0516200	Q8I3U6	40S ribosomal protein S11	–	PF3D7_1369400	C0H5L6	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_0206800	P50498	merozoite surface protein 2	–	PF3D7_1207000	Q8I5X5	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1026800	Q8IJD4	40S ribosomal protein S2	–	PF3D7_1024800	Q8IJF6	exported protein 3	–
PF3D7_1465900	Q8IKH8	40S ribosomal protein S3	2	PF3D7_0809100	Q8IAS7	erythrocyte membrane protein 1 PfEMP1	–

Fontes: PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Tabela 4. Listas de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, eluídas na Cromatografia de Afinidade à Calmodulina (**terceira eluição:** 500µL de tampão de equilíbrio – HEPES 500mM, pH 7,4; uréia 8M).

(Conclusão)

Ac. PlasmoDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺	Ac. PlasmoDB	Ac. UniProt	Proteína	Repetições ⁺
PF3D7_0109800	Q8I246	phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	–	PF3D7_0302900	O77312	exportin-1*	–
PF3D7_1108700	Q8IIR6	heat shock protein J2	–	PF3D7_1219600	Q8I5L4	aminophospholipid-transporting P-ATPase	–
PF3D7_1422800	Q8ILM5	actin-related protein*	–	PF3D7_0800300	Q8IAK3	erythrocyte membrane protein 1 PfEMP1	–
PF3D7_0527000	Q8I3J5	DNA replication licensing factor MCM3*	2	PF3D7_1023900	Q8IJG6	chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 homolog*	–
PF3D7_1206200	Q8I5Y3	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C*	2	PF3D7_0706000	C0H4L1	importin-7 putative	–
PF3D7_1328500	Q8IE45	alpha/beta-hydrolase*	–	PF3D7_0706500	C0H4L6	conserved Plasmodium protein unknown function	–
PF3D7_1105700	Q8IIU6	tRNA-splicing ligase RtcB*	–	PF3D7_1225700	Q8I5G0	VAC14 domain-containing protein*	–

Fontes: PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Notas:

* Proteína putativa.

+ Quantas vezes a proteína apareceu na lista final de proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

