

Université Pierre et Marie Curie

Universidade de Brasília

Ecole doctorale Complexité du Vivant/ Programa de Patologia Molecular

**Etude des événements moléculaires de la gamétogenèse de
Plasmodium berghei par des approches protéomiques**

*ESTUDO DOS EVENTOS MOLECULARES DA
GAMETOGÊNESE DE Plasmodium berghei POR
ABORDAGENS PROTEÔMICAS*

Par Carlos Henrique SARAIVA GARCIA

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas/ Laboratoire Adaptation des Protistes à
leur Environnement

Thèse de doctorat en Pathologie Moléculaire

Tese de doutorado em Patologia Molecular

Dirigée par Philippe GRELLIER et Sébastien Olivier CHARNEAU

Présentée et soutenue publiquement le 27/10/2016

Devant un jury composé de :

BOZZA, Marcelo Torres – Professeur et rapporteur

CARVALHO, Paulo Costa – Chercheur et rapporteur

VAQUERO, Catherine – Directeur de Recherche INSERM – Présidente

De SOUSA, Marcelo Valle – Professeur et examinateur

SANTANA, Jaime Martins – Professeur et examinateur

GRELLIER, Philippe – Professeur et co-directeur de thèse

CHARNEAU, Sébastien Olivier – Professeur et co-directeur de thèse

*"Les mots prennent toujours la couleur des actions ou des sacrifices qu'ils suscitent."
Lettres à un ami allemand (1945), Albert Camus*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a meus orientadores, Prof. Sebastien Olivier Chaneau e Prof. Philippe Grellier por todo suporte ao longo destes anos de trabalho para a realização deste projeto.

Sou grato também àquelas pessoas que não participaram deste projeto mas que estiveram comigo nesta jornada e de alguma forma estiveram aqui comigo entre estas palavras: Sônia Nogueira da Gama Gondim, Elinda Saraiva Garcia, Marina Saraiva Garcia, Ana Paula Saraiva Garcia, Maria Luiza Saraiva Calgaro, Maria Eduarda Saraiva Soares, Giovana Saraiva Calgaro, Leda Saraiva Viana, José Leitão Viana, Rafael Saraiva Viana, Márcia Saraiva Viana, Murilo Rabelo, Letícia Saraiva Rabelo, Beatriz Saraiva Rabelo e Ana Júlia Vieira de Ribeiro.

Meus agradecimentos a meus colegas e professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas e aos colegas do Laboratoire de Biodiversité et Adaptation des Microorganismes Eucaryotes à leur Environnement.

Agradecimentos as instituições e fomentadores

Aknowledgements

This work was supported by CAPES/COFECUB programme [723/11], MCTI/CNPq/FNDCT/PRO-CENTRO-OESTE [407730/2013-3 and 407855/2013-0], CAPES/Incentivo a Pesquisa em Parasitologia Básica [23038.005298/2011-83], FAPDF [193.000.987], CNPq, Finep, Fundação Hemocentro de Brasília, École Doctorale Complexité du Vivant à l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Muséum National d'Histoire Naturelle na França and Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB).

Funding sources had no involvement in study design, data collection or interpretation or decision on publication submission.

Sumário

Agradecimentos	2
Agradecimentos as instituições e fomentadores	3
Sumário	4
1. Introdução	6
1.1. Breve história da malária	8
1.2. História da malária no Brasil	13
1.3. Aspectos epidemiológicos da malária	18
1.3.1. Epidemiologia da malária no Brasil e aspectos socioeconômicos	21
1.3.2. Malária na França	22
1.4. Estratégias científicas para erradicação	24
1.5. Condutas para prevenção e tratamento	27
1.6. Agentes etiológicos e modo de transmissão	30
1.7. Vetores transmissores e hospedeiros	33
1.8. A biologia reprodutiva dos plasmódios	38
1.8.1. Fase reprodutiva assexuada do Plasmodium	39
1.8.2. Fase reprodutiva sexuada do Plasmodium	41
1.8.2.1. Fertilização e proliferação no mosquito	43
1.9. Morfologia dos gametócitos	46
1.10. Diferenciação em gametas e exflagelação	48
1.11. Malária de roedores – Plasmodium berghei	52
1.12. Cinesinas	56
1.12.2. A motilidade das cinesinas	58
1.12.3. Regulação de cinesinas	59
1.12.4. A cinesina 8 em Plasmodium	59
1.12.5. A cinesina 8 em Plasmodium berghei	62
1.13. Proteômica e proteoma de Plasmodium	65
1.14. Fosfoproteoma de Plasmodium	68
2. Justificativa científica	74
3. Objetivos gerais	75
4. Materiais e métodos	76
4.1. Produção de gametócitos	76
4.2. Separação das células	77
4.3. Obtenção das triplicatas biológicas	77
4.4. Lise celular e extração de proteínas	78
4.5. Precipitação de proteínas	79
4.6. Hidrólise enzimática de proteínas	80
4.7. Dessalinização de amostra	81
4.8. Quantificação de peptídeos	82
4.9. Marcação de peptídeos por iTRAQ	82
4.10. Preparação de amostras multiplexadas	83
4.11. Enriquecimento de fosfopeptídeos por TiO ₂	86
4.12. Dessalinização de peptídeos por STAGETIP para espectrometria de massas	86
4.13. Espectrometria de massas	87
4.14. Processamento de dados	88
4.15. Identificação de proteínas	88
4.16. Ontologia de genes	90
5. Resultados	91

5.1. Parte I - Dynamic molecular events associated to Plasmodium berghei gametogenesis through proteomic and phosphoproteomic approaches.....	92
5.2. Parte II - Deciphering the kinesin 8 role during Plasmodium berghei gametogenesis by proteomic and phosphoproteomic approaches.....	153
6. Conclusão.....	209
7. Bibliografia	212
8. Índice de figuras.....	229
9. Índice de tabelas.....	231
10. Resumos.....	233

1. Introdução

A malária é uma patologia provocada no homem por organismos unicelulares pertencentes ao gênero *Plasmodium*. No ano de 2015, a malária ganhou notoriedade na imprensa internacional após a outorga do Premio Nobel de Medicina à professora chinesa Youyou Tu pela descoberta da artemisina, um composto utilizado no tratamento de pacientes infectados e que engendrou drástica redução do número de mortes pela doença (Assembly, 2015).

A importância do tema remonta de mais de 200 anos e já rendeu outros 4 Prêmio Nobel a Sir Ronald Ross (Assembly, 1902), Charles Louis Alphonse Laveran (Assembly, 1907), Julius Wagner-Jauregg (Assembly, 1927) e Paul Hermann Müller (Assembly, 1948). Dentre esses, Alphonse Laveran foi o primeiro Prêmio Nobel de medicina da França.

Os vários prêmios Nobel outorgados refletem a dimensão e relevância do tema para a saúde pública e para o desenvolvimento econômico dos Estados. Incentivos e campanhas propiciaram o desenvolvimento de políticas públicas de combate, prevenção e formação de redes de pesquisas (Keating, 2014).

Apesar da enormidade de trabalhos científicos e da difusão de informações sobre a malária nos recentes anos, a doença ainda provoca onerosos gastos em saúde pública e em pesquisa científica (Ricci, 2012;WHO, 2015c) e permanece como epidemia em diversos países, enquanto, em outros países, ela acontece por casos de importação e transmissão congênita. Contudo, ainda não foram desenvolvidas uma vacina ou estratégias de combates que eliminem o fardo. O tratamento utilizado para curar pacientes acometidos pela malária tem tomado a maior parte dos recursos dos programas de combate a essa doença. Sua possível erradicação requer o investimento de recursos para prevenção da transmissão do parasita para o homem como também o bloqueio da transmissão do parasita do homem para o mosquito.

Para a prevenção da doença, há uma demanda pela formulação de um corpo de conhecimento que possibilite um melhor entendimento da biologia do parasita e, desta forma, amplie a gama de alvos terapêuticos, permitindo, portanto, um melhor enfrentamento da transmissão, da infecção e da reprodução do parasita. Os estágios de desenvolvimento sexuais são essenciais para a continuidade da proliferação do parasita e, por esta razão, são considerados um alvo capital para a construção de vacinas e fármacos que interrompam o

ciclo reprodutivo (Guttery et al., 2012b). Portanto, este trabalho procura contribuir na formação de um corpo de conhecimento do estágio gametocítico do parasita a fim de propiciar a atenuação ou o bloqueio definitivo à etiologia.

1.1. Breve história da malária

A malária possivelmente é a doença de maior importância, a mais antiga, a mais amplamente distribuída e a que mais assolou dentre todas as doenças a que o ser humano esteve sujeito que se tem conhecimento na história da medicina (North, 1896). Talvez não tenha existido uma doença em que tão grande número de teorias de contágio tenham sido formuladas, em que tão grande número de organismos tenham sido investigados e nem que tão grande número deles tenham sido atestado como, comprovadamente, o verdadeiro agente causador da malária.

De maneira similar, são inúmeros os termos utilizados para designar a doença. Temos, no princípio do século XIX, nos anos de 1842, quando Jean-Christian-Marc Boudin publicou seu livro intitulado *Traité des fièvres intermittentes, rémittentes et continues des pays chauds et des contrées marécageuses*, a patologia nominada como febre intermitente, febre rémitente, febre pseudo-continuada, febre latente, febre perniciosa e febre de países quentes (Boudin, 1842). Ao final do século XIX, na medida em que o conhecimento sobre a doença se ampliava, também era conhecida por febre palustre, febre telúrica, febre miasmática, febre fito-hémica, febre marematica, febre intermitente (Moreira, 1890). Na atualidade, final de 2015, a malária é reputada como uma doença endêmica de países tropicais provocada em homens, répteis, aves e outros mamíferos por organismos do gênero *Plasmodium spp.* e transmitida por insetos anofelinos, do gênero *Anopheles*. Com maior rigor de diagnóstico, sintomas e diagnósticos da malária são atribuídos com maior acerto e referidos na atualidade pelos nomes de impaludismo, paludismo, febre palustre, febre intermitente, febre terçã benigna, febre terçã maligna, cachexia palustre, além de popularmente conhecida por maleita, sezão, tremedeira, batedeira, febre e febre de São Paulo.

Os primeiros registros que se tem notícia de seres humanos com o que supõe-se ser a malária datam de mais de 4700 anos na China, porém diversos outros já foram encontrados, como os da Mesopotâmia em 2000 A.C., do Egito em 1570 A.C., de Homer em 850 A.C., de Hindus de 600 A.C. e de Empédocles de Agrigento em 550 A.C. (Cox, 2010b). Todavia, foi em 400 anos A.C. que o pai da medicina, Hipócrates, consagrou um capítulo especial para discutir sobre a patologia: *De natura palustrium et lacustrium aquarum* (Boudin, 1842).

Desde Hipócrates já existia a ideia de que o pântano tem papel importante na etiologia da malária, como se pode observar pela etimologia de um dos nomes dados à doença: o paludismo. Esse termo foi comumente empregado para referir-se à essa patologia na Europa a partir do século XVIII e teve como origem o vocábulo *palus* do latim, que literalmente significa “pântano” (Sampaio, 1872b;CNRpalu, 2015b). O termo malária também foi atribuído segundo a crença de que "ares ruins" contribuiriam no seu desenvolvimento. Portanto, apesar de controvérsias, a origem mais aceita desse termo é a partir da expressão *mal'aire*, do italiano antigo, que significa “ar estragado” ou “ar ruim”, que adoeceria as pessoas que a ele estivessem sujeitos (Cox, 2010b).

Portanto segundo as definições da época, doenças eram ocasionadas por miasmas e eflúvios (Boudin, 1842;Sampaio, 1872a;Castanheira, 1885). A teoria miasmática foi a principal linha teórica confiada por diversos estudiosos para explicar o contágio pela malária até o final do século XIX. No entanto, a teoria parasitária não era nova nas cercanias da formulação da teoria dos germes. Ela é antiga e surgiu ainda na Idade Antiga. Pela hipótese parasitária, as doenças do pântano eram causadas por pequenos insetos que penetrariam no corpo (Houzeau, 1874-1889). Em seguida, a teoria estendeu-se na Idade Moderna para infecção provocada por seres microscópicos capazes de penetrar epitélios, chamados na Itália de *serafici* ou “causadora de morte” (Kreier, 2012).

Ainda como complicador para a investigação da doença, havia alguma confusão quanto ao diagnóstico de algumas doenças com alguns sintomas semelhantes, como a febre tifoide e a febre amarela, com a malária (Boudin, 1842). Os sintomas da doença começam a ser melhor diferenciados a partir de 1868 (Pearce, 2002) com o aprimoramento da termometria e definição de temperatura corporal basal (Gorzoni et al., 2010) por Karl August Wunderlich (1868).

Em 1876, Matteo Lanzi e Guglielmo Terrigi também realizaram experimento com infecção de cobaias com orvalho coletado de pântanos endêmicos e encontraram, nestes animais, pigmentos no baço e no fígado destes animais que são análogos àqueles que existem no sangue das pessoas falecidas pela forma mais grave da malária. Eles cultivaram os elementos pigmentados e acreditaram ter conseguido isolar o patógeno, uma bactéria acastanhada, o que explicaria a coloração dos pigmentos, e a qual deram o nome de *Bacteridium brunneum* (Laveran, 1898).

Em 1879, Theodor Albrecht Edwin Klebs e Corrado Tommasi Crudeli retomaram as experiências de Lanzi e Terrigi de 1876, mas com o intuito de melhor controlar as condições experimentais a fim de reproduzir a descoberta dos germes causadores da malária. Os pesquisadores observaram que um destes organismos estava presente no ar, na água e na lama dos pântanos como também no sangue dos animais inoculados. O bacilo com aspecto de esporo móvel, ovalado e reflexivo de luz solar, quando inoculado em animais, causava febre intermitente. Foi, portanto, chamado de *Bacillus malariae* (Laveran, 1898).

Em 1878, no departamento de Bône na Argélia, enquanto autopsiava óbitos por malária, Laveran se atentou quanto à pigmentação decorrente da doença como um sinal bastante específico da malária (Laveran, 1898). A pigmentação estava presente no sangue, que é um tecido ostensivamente afetado pela doença em aparência e composição (Sampaio, 1872a), como uma substância espalhada no sangue sob forma de finas granulações negras, produto da patologia, chamada de pigmentos da malária ou melanina, conforme já havia sido indicado por Mickel, Virchow e Freirich (Pinto, 1904). Ao estudar o sangue humano de doentes, Laveran observou, no final de 1880, em Constantina, que estes corpos esféricos pigmentados eram corpos celulares e flagelados. Isto lhe forneceu indícios de que a doença era causada por um parasita que estava presente no sangue. Estes parasitas foram chamados por ele de *Oscillaria malárias*, depois de hematozoário do paludismo e, pela denominação de Marchiafava e Celli, de *Plasmodium malariae* por ser um organismo protoplasmático, de movimentos ameboides, que é encontrado dentro do plasma de glóbulos vermelhos (North, 1896; Laveran, 1898).

Ao final de 1880, Laveran publicou acerca da presença do parasita no sangue (Roche et al., 1880) e, ao final de 1881, o descreveu no trabalho *Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme, description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre* (Laveran, 1881a). Após a descoberta do hematozoário causador da malária, a próxima pergunta a se elucidar era qual o vetor do parasita. Em 1896, já se conhecia 5 espécies de vetores da malária humana (Silva, 1896). Com quase 30 anos, em 1909, se tinha conhecimento de mais de 20 espécies mosquitos transmissores do gênero *Anopheles* (Alvares, 1909). No ano de 1948, Shortt e Garnham descreveram o ciclo hepático da malária a partir de *P. cynomolgi* (Shortt and Garnham, 1948).

Ainda com o transcorrer dos anos, após a descoberta do parasita e de seus vetores, diversos estudos sobre malária tiveram curso por grupos de pesquisa isolados e em diversas

partes do mundo. Em Dezembro de 1977, uma iniciativa importante teve curso por parte de Ken Warren através da Rockefeller Foundation. A malária, juntamente com outras patologias, passou a fazer parte do grupo de doenças da nova disciplina que se iniciava, a das doenças negligenciáveis, que seriam as patologias de grande prevalência e de pouco incentivo de estudo. Portanto, a finalidade do novo empreendimento foi de construir a nível global a primeira coordenação de grupos de pesquisas científicas, com fomento financeiro específico, formação de pesquisadores de excelência e com trabalho de estudantes brilhantes (Keating, 2014).

O pontapé inicial para o projeto foi dado com o programa *The Great Neglected Disease of Mankind* da Fundação Rockefeller. Ele permitiria a projeção de unidades de pesquisas em modernos institutos, universidades e escolas médicas em países desenvolvidos e em desenvolvimento. A partir de 1977, o número de publicações sobre malária teve aumento relevante e progressivo até o ano de 2016. O projeto foi uma influência importante para a ciência biomédica moderna, e a iniciativa configurou um importante episódio para a transformação da medicina em uma prática globalmente integrada e com métricas para avaliação dos impactos e progressos das políticas de combate por parte de financiadores e governo (Keating, 2014).

Em 2001, engajou-se no combate às doenças negligenciáveis a organização não-governamental Médicos Sem Fronteiras em uma campanha chamada: *Fatal Imbalance - The Crisis in Research and Development for Drugs for Neglected Diseases* (Frontières, 2001). Em meados de 2010, a doença já era excluída do corpo de doenças negligenciável (Souza, 2010; FAPESP, 2014). Persistentes e volumosos esforços de pesquisa e investimentos financeiros no tema ao longo dos anos permitiram a remoção da malária do grupo de doença negligenciável no Brasil na acepção empregada por Warren e Médicos Sem Fronteiras. Em 2015, puderam ser contabilizados mais de 1.330.000 trabalhos sobre a malária indexados pela ferramenta Google Scholar quando buscado o termo "Malaria" em todos os documentos nele registrados, sem nenhuma restrição de período de tempo na busca. Um volume crescente de trabalhos é observado ao longo dos anos também por outras indexações como pela PubMed, U.S. National Library of Medicine (Figura 1).

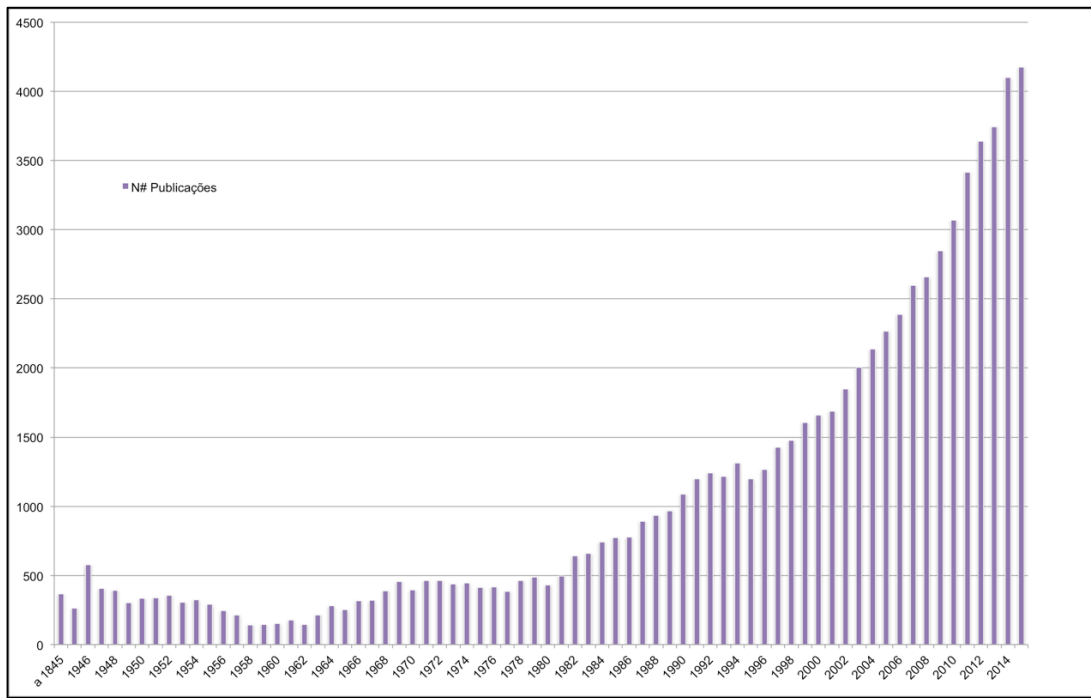


Figura 1 : Número de publicações sobre malária indexados no PubMed de 1845 a 2016. Dados de 1845 a 1945 foram somados e representados em uma única barra no gráfico.

1.2. História da malária no Brasil

A história da malária no restante do globo tem algumas similaridades com a história da malária no Brasil no aspecto da investigação da patologia e suas descobertas (Torres-Homem, 1877) como também nas interpretações dos quadros clínicos (Torres-Homem, 1877).

No Rio de Janeiro, ao mesmo tempo em que tinha curso a reforma de Haussmann em Paris (1853-1870), possivelmente os componentes do plano de remodelação urbana carioca já eram projetados (Benchimol, 2000) e teriam seus efeitos nas medidas dos prefeitos da Guanabara, ao final do século XIX e início do XX, para atenuar os impactos econômicos e sociais causados pela malária. O fardo se refletia nos países endêmicos em ditos populares, como o de que *“Todo o branco que trabalha na terra, cava nela também a sua sepultura”* (Acabado, 1900), pelas questões de suscetibilidades relacionadas à etnia e à frequência de ocorrência de casos.

Durante o governo dos ex-prefeitos Candido Barata Ribeiro e Pereira Passos, no Rio de Janeiro, teriam ocorrido desapropriações de cortiços e regiões com população de baixo poder econômico com intuito de sanitização em vista das frequentes epidemias por que a cidade passava, além da remodelação da malha viária municipal. Portanto, a malária seria possivelmente uma das influências para o surgimento das primeiras favelas no Brasil.

O Congresso Nacional de Medicina e Cirurgia se reuniria em 1889 com o objetivo de tomar decisões que pudessem mitigar os frequentes eventos epidemiológicos por que passava a cidade (Benchimol, 2000). As resoluções projetadas eram tomadas à luz da teoria sustentada por Pettenkofers, que atribuía a sazonalidade da malária a pântanos subterrâneos que precisavam ser combatidos. De acordo com a teoria, com as elevações do nível da água da zona freática do solo do Rio de Janeiro, em decorrência das chuvas do verão até o mês de Março, os germes alcançavam as condições propícias do solo para se desenvolver e produzir miasmas (Benchimol and Sá, 2005) em condição análoga a dos pântanos descobertos (Moreira, 1890). Os lençóis freáticos seriam mais importantes para o curso das doenças do solo do que cursos d'água próximos (Weber, 1865).

As modelações das ações do homem sob influência dos episódios de epidemia da malária também poderiam ser observadas na construção das estradas de ferro brasileiras como

também em óbitos e recuo de tropas na Guerra do Paraguai. Nessa guerra, no período entre 1864 a 1870, mais gente teria morrido em consequência das enfermidades do que de ações bélicas (Marinha, 1870). A batalha da Retirada da Laguna teria trazido uma baixa de cerca de 400 soldados por dia depois que esses atravessavam áreas alagadiças de reprodução do mosquito, sendo essas baixas a possível causa para retirada das tropas (de Castro Souza, 1972).

A construção das estradas de ferro, como a ferrovia do Estado de São Paulo, na região da Serra do Mar, para ligação São Paulo–Santos no período entre 1897-1898, precisou ser interrompida por consequência da epidemia que se abateu sobre os trabalhadores do empreendimento (Benchimol and Sá, 2005). O mesmo aconteceu na construção da ferrovia Madeira e Mamoré em Rondônia entre 1907-1912, com a diferença na gravidade dos casos em Rondônia ser maior (Benchimol and Sá, 2005), ao "risco, para não dizer com todas as probabilidades, de sacrificar a própria vida" (Mamoré, 1885). Na Serra do Mar, entre Santa Catarina e Paraná no período entre 1880-1885, a malária surgiu com grande intensidade durante os trabalhos de construção da malha ferroviária Paranaguá–Curitiba (Costa, 1885).

Além desses casps, a malária causava perdas em todas regiões de Norte a Sul do Brasil. No entanto, Laveran publicou, em 1898, que febres intermitentes no Brasil eram mais comuns nas costas, junto ao mar. A partir dos vales, elas se tornavam cada vez mais raras na medida que se alcançava maiores altitudes (Laveran, 1898). Os rios brasileiros produzem mangues e emanações deletérias no curso dos rios e igarapés devido a inundações anuais ou na região de sua foz com o mar. Portanto, as formas mais graves da doença estariam nas proximidade do Rio Amazonas e seus afluentes, do Rio Paranaíba, do Rio São Francisco, e de outros (Corre, 1887).

No alto Paraguai e Paraná, os casos também eram igualmente frequentes em várias localidades na costa do Atlântico, como no Rio de Janeiro, onde mais de 8.000 casos de febre intermitente foram tratados em um mesmo hospital durante em seis anos (Corre, 1887). Na região de Florianópolis, em Santa Catarina, H. Rey, em 1877, reporta nos Arquivos de Medicina Naval francês que febres intermitentes estariam longe de serem raras (Rey, 1877). A incidência dos casos de malária era elevada nos arredores de alagados e terrenos pantanosos, nos arredores das Lagoa de Nossa Senhora da Conceição e eram mais observados no verão (Rey, 1877;Costa, 1885). Desde as regiões mais ao norte, mas também ao sul do Brasil, na região do Prata, as embarcações já eram fortemente afetadas pela malária (Bourel-Roncière,

1872). Colin registra, em 1870, que grave epidemia assolava a cidade do Rio de Janeiro e diversas outras cidades e teve princípio com as grandes migrações ao Brasil em 1835 (Colin, 1870).

Contudo, a documentação sobre a malária no Brasil e sua influência em seus habitantes antecede o século XIX, apesar de mais detalhada para o período. Jacques Lind registrou, em 1777, que o ar no Brasil era bom e, portanto, era estimado pelos portugueses como um paraíso (Lind and de La Chaume, 1777). No mesmo período, no entanto, temos o registro do óbito de dois engenheiros militares italianos, Enrico Antonio Galluzzi de Mantova e Domenico Sambuceti, pela causa da malária, em 1769, na Amazônia, e 1780, no Mato Grosso, respectivamente. Eles estavam encarregados da construção de fortalezas da coroa portuguesa (Fontana, 2005). A malária neste período não parecia ser uma novidade nem apresentar ocorrência isolada, como constatado pela familiaridade do diagnóstico pela medicina colonial da época.

Os registros sobre casos de malária no Brasil antes de XIX trazem evidências de que os casos de malária não tiveram início com as grandes imigrações colonizadoras do princípio do século XIX. O Brasil suscitava horror aos europeus por ser tido como uma das regiões mais insalubres dos trópicos ao longo de todo o século XIX (Figueiredo et al., 1996). Nessa época, a malária afetava principalmente o litoral brasileiro, a região mais densamente colonizada e, portanto, em que se tem a maior riqueza de documentação nos registros.

A confirmação da existência do parasita da malária no Brasil foi feita por Francisco de Paula Fajardo Júnior, em 1893, e por Miranda Azevedo (Laveran, 1898). Fajardo foi considerado pela imprensa médica carioca como o ‘descobridor’ do hematozoário de Laveran no Brasil. No mesmo ano de 1893, o médico sanitarista Adolpho Lutz iniciou um dos primeiros trabalhos de investigação sobre a malária que se tem registro. Lutz demonstrou a natureza não palúdica das febres paulistas; identificou e estudou aspectos morfológicos de plasmódios presentes no Brasil; determinou quais eram as espécies de vetores (Figura 2); e estabeleceu medidas de saneamento para combate (Corrêa, 1955).



Figura 2 : *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, 1903. Primeiro vetor descrito por Aldopho Lutz como provável causador da malária no Brasil na região do interior do Estado de São Paulo (Lutz).

Antes de 1877, data em que foi comprovada a transmissibilidade de filarias por mosquitos, a suspeita de mosquitos como vetores de doenças era uma hipótese debatida pela comunidade científica. (Manson, 1878; King, 1883) Esse debate se estendeu à malária a partir de 1883, devido a evidências colecionadas por Albert King (King, 1883). Em 1899, foi confirmado que a malária era transmitida ao homem por mosquito. Em 1898, Lutz suspeitava que um vetor da malária seria um anofelino descoberto durante suas incursões de investigação sobre a febre paulista, *Anopheles cruzii*. Contudo, ele não dispunha de aparelhagem de microscopia que o permitisse fazer a comprovação causal com evidências científicas (Lutz, 1936).

As investigações de Lutz sobre a doença concentraram-se de início na barra de Santos e nas áreas de pântano e ele deparou-se por duas vezes com doentes pelo *Plasmodium malariae* em 1893. Em relatório de 1895, ele descreveria mais três casos da doença (Benchimol and Sá, 2005). Em seguida aos trabalhos de Lutz, somou-se os trabalhos do médico sanitarista Carlos Chagas, que relatou surto de malária a 700 metros de altitude em 1906 (Benchimol and Sá, 2005), e outros pesquisadores que se seguiram desde então.

De acordo com consulta realizada na ferramenta Web of Science, de 1945 a 2015, trabalhos de brasileiros sobre a malária constituíram cerca de 3% das publicações mundiais, atrás de EUA com 30%, além de UK, FR e outros. O número de trabalhos brasileiros foi de 2.259 publicações científicas em periódicos internacionais e livros.

1.3. Aspectos epidemiológicos da malária

A OMS reporta que o número de acometidos pela malária de 2000 a 2015 é de cerca de 1,2 bilhões. Deste total, 6,2 milhões evoluíram para o óbito. Para 2015, a estimativa de ocorrências ficou entre 149-303 milhões de novos casos e 236-635 mil óbitos em todo o mundo (WHO, 2015c).
Número de mortes evitadas:

Quando comparados 2000 e 2015, houve redução da incidência da malária em 37% e 60% de redução dos casos de óbito, o que pode ser uma estimativa otimista se levadas em conta outras projeções como a do Seattle Institute for Health Metrics, que apontou duas vezes mais casos de morbidade e de mortalidade para o ano de 2010 (Murray et al., 2012).

Entre 2010, 2013 e 2015 houve pouca variação no número de países com a malária endêmica, com 106, 99 e 96 países acometidos, respectivamente, nesses anos. A maioria deles são países em desenvolvimento e na zona intertropical, como representado na Figura 3 (WHO, 2010;Heppner, 2013;WHO, 2014;2015c). Mesmo com cerca de 2,5 bilhões de dólares gastos anualmente no combate e prevenção da doença por fundos nacionais e mundiais, como o PMI, o Programa Nacional de Controle da Malária, o Fundo Global e o Banco Mundial, quase metade da população mundial, cerca de 3,2 bilhões de pessoas, estão expostas ao risco de adquirir a doença (WHO, 2015c).

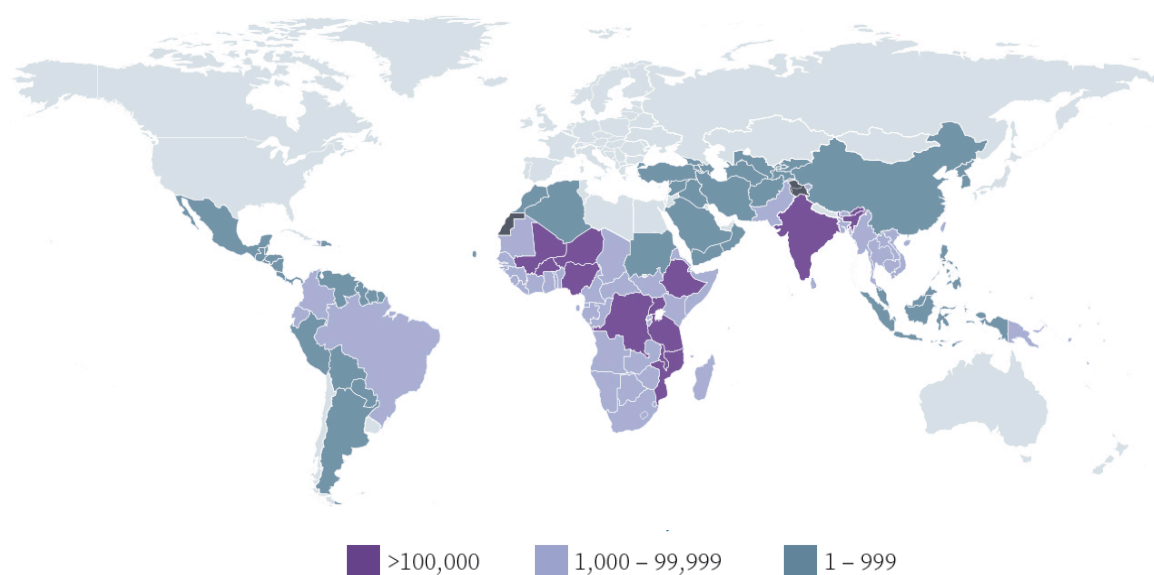


Figura 3 : Distribuição geográfica da malária no Mundo. A malária é transmitida em áreas tropicais e subtropicais. O mapa tem representado o número de mortes evitadas no período entre 2001 a 2013. Modificada de Relatório sobre Malária de 2014 (WHO, 2014).

Na atualidade, a maior parte dos óbitos pela malária ocorrem na África (87,9%), seguido pelo sudeste da Ásia (9,3%), pela região oriental do Mediterrâneo (1,8%), pela região das Américas (0,3%) e pela região ocidental do Pacífico (0,7%), segundo estimativa de 2015 (WHO, 2015c). Em alguns países, o alto risco de infecção alcança mais de 90% da população, como no caso de Angola, Congo, Gabão e Senegal, dentre outros em 2011 (WHO, 2011).

A região das Américas (Figura 4) é composta por 21 países com a malária endêmica. Três destes países foram responsáveis por 77% dos casos de malária em 2013: Brasil (37%), Venezuela (23%) e Colômbia (17%) (WHO, 2015c). Para a região, em 2015, 121 milhões de pessoas (20%) estiveram em risco de infecção dos cerca de 600 milhões de indivíduos dos 21 países. Destes, 20 milhões (3,3%) foram categorizados como sujeitos a elevado risco de contraírem (WHO, 2015c). A Venezuela tem apresentado um aumento dos índices desde 2008 e em 2014 atingiu o maior número de casos de incidência dos últimos 50 anos (WHO, 2015c). Acredita-se que a mineração de ouro seja uma das principais causas do crescente número de acometidos pela malária no país (Moreno et al., 2009;BBC, 2014).

Contudo, no cálculo geral dos anos de 2000 a 2015, a região das Américas reduziu a morbidade em 74% e a mortalidade em quase 72% (WHO, 2015c). A expectativa é que a região alcance o quadro de 12,1 milhões de casos e 24 mil óbitos até 2030.



Figura 4 : Mapa das Américas Centrais e do Sul com status percentual de risco populacional e fases de programa estratégico: fases de controle, pré-eliminação, eliminação e prevenção de reintrodução da malária.

Quanto ao financiamento para prevenção e combate da malária por fundos internacionais, de 2005 a 2015 foram investidos cerca de 20 bilhões de dólares em todo o mundo. A previsão é de que será investido cerca de 100 bilhões de dólares de 2015 a 2030, dos quais 24,2 bilhões serão distribuídos no intervalo de 2015-2020; US\$35,95 bilhões de 2020-2025; US\$ 41,5 bilhões de 2025-2030 (WHO, 2015c). Outros 10 bilhões adicionais, US\$ 673 milhões anuais, devem ser implementados para finalidade de pesquisa e desenvolvimento até 2030 a fim de eliminar a malária em ao menos 35 dos países endêmicos e reduzir morbidade e mortalidade em 90% em comparação com dados de 2015 (WHO, 2015a).

1.3.1. Epidemiologia da malária no Brasil e aspectos socioeconômicos

No Brasil, em 2014, cerca de 20% da população, correspondendo a 42 milhões de brasileiros, estiveram sujeitos ao risco de contrair a malária. Dentre esses, 2,3% (4,7 milhões) estiveram em categoria de alto risco (WHO, 2015c). A proporção de indivíduos corresponde a toda população da Argentina em situação de risco e toda a população da Costa Rica em situação de alto risco de infecção por malária no ano de 2014.

No território brasileiro, a região de maior incidência da malária é a região da Amazônia Legal. A Amazônia Legal corresponde a unidades político-administrativas do Brasil com base em suas características climáticas. Sua extensão territorial é de aproximadamente 5 mil km² e abarca a área dos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins em totalidade e parcialmente o Estado do Mato Grosso e do Estado do Maranhão.

Entre 2004 e 2012, todos os Estados da região da Amazônia Legal apresentaram redução de seus indicadores de morbidade (Figura 5) e de mortalidade apesar de haver aumento do índice para alguns Estados no transcurso dos anos. Entre 2004 e 2014, o número de hospitalizações por ocorrências de casos de malária caiu em 84% e de morte em 61%. Isto diminuiu custos em tratamento. A projeção de redução da incidência de casos, entre 2004-2014, foi de 69% (OPAS, 2015) e, entre 2000-2015, foi de 75% (WHO, 2015c).

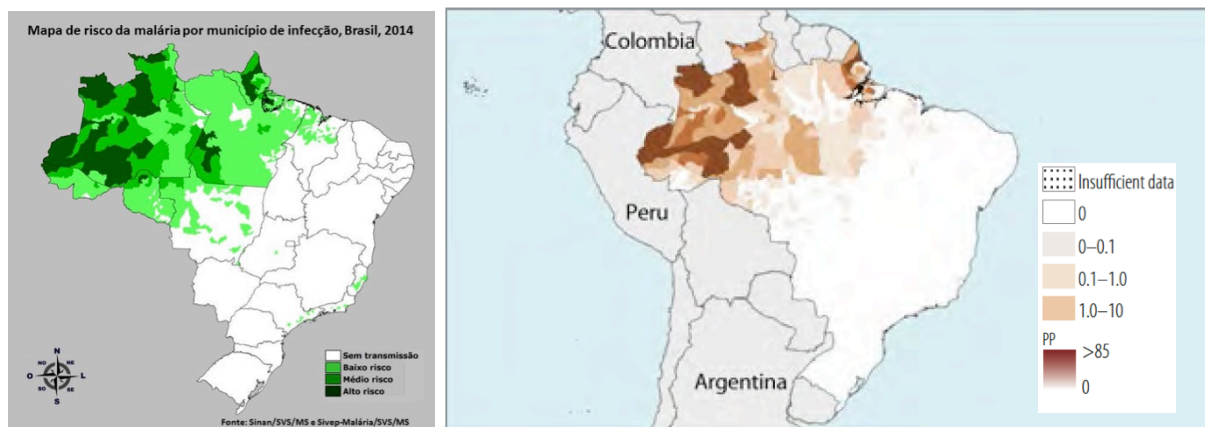


Figura 5 : Mapa de risco da malária no Brasil de acordo com o Ministério da Saúde para 2014 (MS, 2014b) (A) e áreas de maior incidência de casos de malária no Brasil em 2015 (B), pelo relatório da OMS de 2015. Distribuição de casos confirmados da malária (por 1000 habitantes).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde e a Organização Mundial da Saúde, o Brasil tem praticado redução dos casos de malária a cada ano. Em 2014, foi atingido o patamar mais baixo de casos nos últimos 35 anos. O número total de casos foi de 143.250. Um total de 4.999 municipalidades ingressaram em fase de prevenção de reintrodução da doença, 433 municípios em fase de eliminação e 138 em fase de controle (OPAS, 2015).

1.3.2. Malária na França

Após a segunda guerra mundial e no final do século XX, era observado na França e na Espanha um decréscimo significativo dos casos maláricos endêmicos, com um esforço para eliminar o risco de reintrodução da endemicidade da patologia (Rodhain and Charmot, 1982; Beauchamp, 1988; Fatica, 2006). Para tanto, a França emitiu em 1962 um selo comemorativo para celebrar a luta pela erradicação da malária (Figura 6).



Figura 6 : Selo intitulado *La lutte contre le paludisme* de autoria de René Cottet. Foi emitida em 1962 pela La Poste, inicialmente em Paris, em comemoração a luta pela erradicação da malária (Cottet, 1962).

A partir do início do século XX, os casos de paludismo na França passaram a ser, quase que na sua totalidade, somente casos de malária de importação. São casos alóctones, importados por viajantes (Poncon et al., 2007; CNRpalu, 2010;2011;2012;2013;2014; Behrens et al., 2015; CNRpalu, 2015a). Contudo, alguns casos pontuais de malária autóctones ainda

ocorrem e suas ocorrências são registradas pelo Centro Nacional de Referência de Malária da França (CNRpalu).

Na França, o número de casos de malária de importação esteve em queda desde 2000 até 2007, mesmo sob pressão de um crescente número de viajantes. Para o ano de 2014, houve 2.299 casos de malária declarados ao CNRpalu, distribuídos por todo o país. Dois dos casos foram presumidos como autóctones aeroportuários. No entanto, o número de casos de paludismos estimados foram de 4.370 casos (CNRpalu, 2015a). Assim como em anos anteriores, os casos foram em sua maioria, 96%, de origem Africana, da região subsaariana. Os casos de malária causada por *Plasmodium falciparum* foram de 86%, próximo da porcentagem reportada em 2013. O número de formas graves foi de 311 casos, o que correspondeu a 13,5% dos casos. Um total de 11 casos evoluíram para óbito, resultando em uma letalidade de 0,48% (CNRpalu, 2015a).

A malária é transmitida atualmente na França principalmente por casos de contágio sanguíneo como transfusionais, congênitos e aeroportuários. Na França metropolitana existem 13 espécies de anofelinos, contudo somente duas espécies são consideradas vetores primários: *Anopheles atroparvus*, na França continental, e *Anopheles labranchiae*, na Córsega (Ponçon et al., 2007).

1.4. Estratégias científicas para erradicação

O tratamento para curar pacientes acometidos pela malária permanece o objetivo primário dos programas de combate a malária. Contudo, a eliminação da malária requer a redução da transmissão do parasita para o homem e a eliminação da infecção latente no fígado.

A pesquisa por medicamentos antimaláricos geralmente focam nos estágios sanguíneos porque eles são responsáveis pelos sintomas da doença e porque as técnicas de manipulação deles foram bem estabelecidas em laboratório a fim de estagnar a evolução clínica da doença. Contudo, o controle e a erradicação da malária requerem o desenvolvimento de medicamentos contra estágios responsáveis pela transmissão e para aqueles que permanecem latentes no fígado (Flannery et al., 2013).

Pesquisas acadêmicas, de institutos de pesquisa e da indústria farmacêutica concebem empreendimentos que ocupam-se do delineamento de abordagens que permitam reduzir o fardo da doença para indivíduos e economias de governos, revertendo o quadro epidemiológico da malária.

As estratégias de intervenção no ciclo reprodutivo do parasito podem ser categorizada em 2 formas gerais: intervenção baseada no parasita e intervenção baseada no hospedeiro. Intervenções baseadas no parasita podem compreender: 1) estágio sanguíneo na forma sexual; 2) estágio sanguíneo na forma assexuada; 3) estágio infeccioso no fígado; 4) estágio latente no fígado; 5) estágios no inseto. Intervenções baseadas no hospedeiro tratam-se de estudos relacionados a respostas metabólicas e imunológicas do homem ao parasita, de roedores e outros mamíferos; e estudos das respostas da entidade dos insetos vetores.

Algumas abordagens estratégicas de estudo são, em relação ao hospedeiro intermediário: no sangue, quanto à invasão parasitária e a replicação e desenvolvimento em eritrócitos infectados; no fígado, quanto à invasão parasitária; quanto à replicação, crescimento e diferenciação de estágio celular, quanto aos mecanismos de evasão imunológicas dos parasitas e quanto aos mecanismos de evasão do parasita aos tratamentos medicamentosos. De um modo geral, temos como possibilidades o estudo da resposta metabólica e imunológica às várias etapas da invasão e estudos sobre o ciclo reprodutivo dos parasitas (Figura 7).

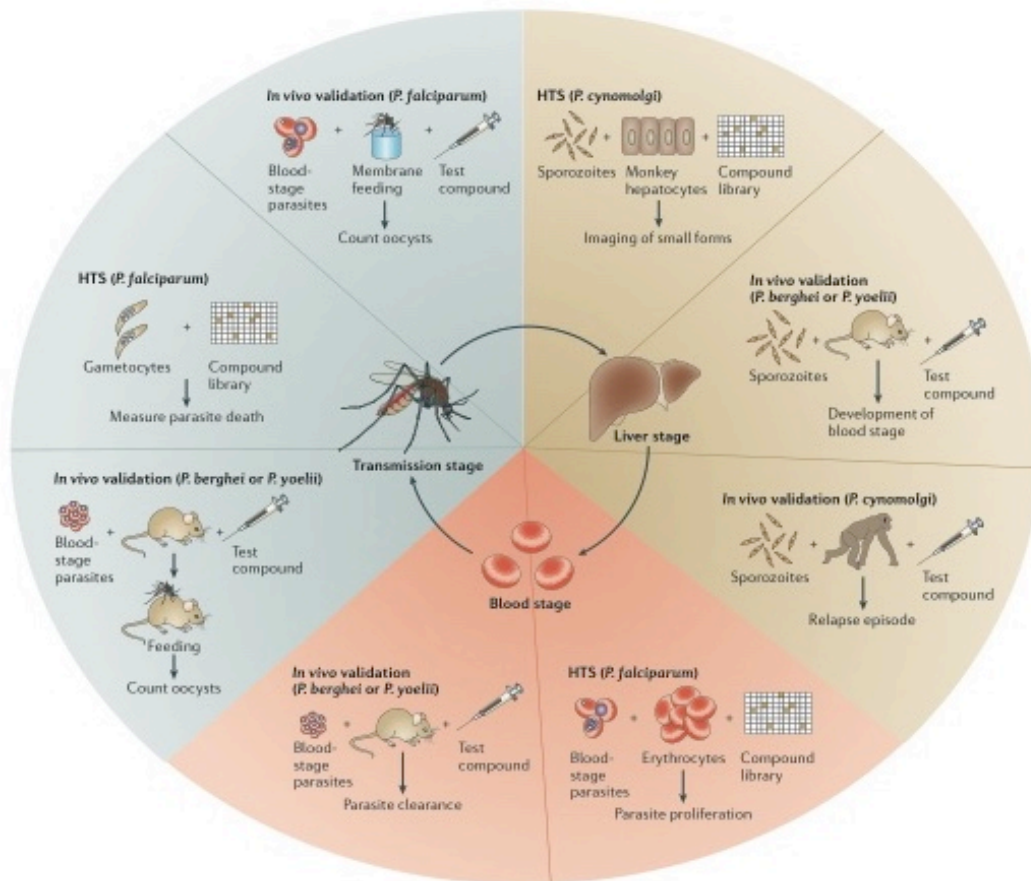


Figura 7 : Diagrama gráfico com principais estratégia para desenvolvimento de fármacos antimaláricos com uso de experimentação animal em estudos de campo (Flannery et al., 2013).

Em relação aos vetores, existem também diversas abordagens possíveis. Nos insetos, hospedeiros definitivos, podem ser realizados estudos desde a formação dos gametócitos até a fecundação dos gametas; quanto à translocação no trato digestório; quanto à diferenciação de oocinets; quanto à formação de esporócitos; quanto à alocação nas células salivares; quanto à resposta metabólica e imunológica nas várias etapas da invasão e ciclo reprodutivo dos parasitas; resposta e resistência a inseticidas; estudos comportamentais dos mosquitos e desenvolvimento de organismos transgênicos.

Embora diversos fármacos sejam funcionais para o tratamento da malária em seu ciclo eritrocitário, derradeiro objetivo é o a descoberta de um composto capaz de suprimir todos os estágios dos ciclos de vida do parasita (Flannery et al., 2013).

1.5. Condutas para prevenção e tratamento

Nos países com doença endêmica, e em países com elevado número de casos de importação, consta a malária na lista de agravos de notificação compulsória. No Brasil, todos os casos de malária devem ser notificado às autoridades de saúde através de ficha de notificação de caso de malária tanto em área endêmica quanto em área não endêmica, permitindo o monitoramento da doença e o delineamento de estratégias de prevenção e de combate.

Os programas de prevenção da malária visam a interrupção do ciclo de transmissão entre o homem e o mosquito através, principalmente, do controle vetorial. Isso leva a algumas ações estratégicas como instalação de redes impregnadas com inseticidas, aplicação intradomiciliar de inseticida de efeito residual, pulverização espacial de inseticida, prevenção de depósitos de água parada para controle larvário do mosquito, controle biológico do mosquito e modificações ambientais (drenagem de área, aterros, modificação de cursos de água, controle da vegetação aquática e limpeza das margens). Há registro de que somente o uso de redes impregnadas reduziram a mortalidade numa taxa aproximada de 55% em crianças abaixo de 5 anos na região subsaariana (WHO, 2015c).

Também são empregadas ações de educação em saúde visando informar sobre a doença, sobre os sintomas e sobre os cuidados do tratamento. Estas são principalmente estratégias que buscam evitar a picada do mosquito e, portanto, impedir que o parasita seja transmitido para o homem, mas também do homem para o mosquito e, portanto, impedir o ciclo de transmissão da malária (Figura 8).

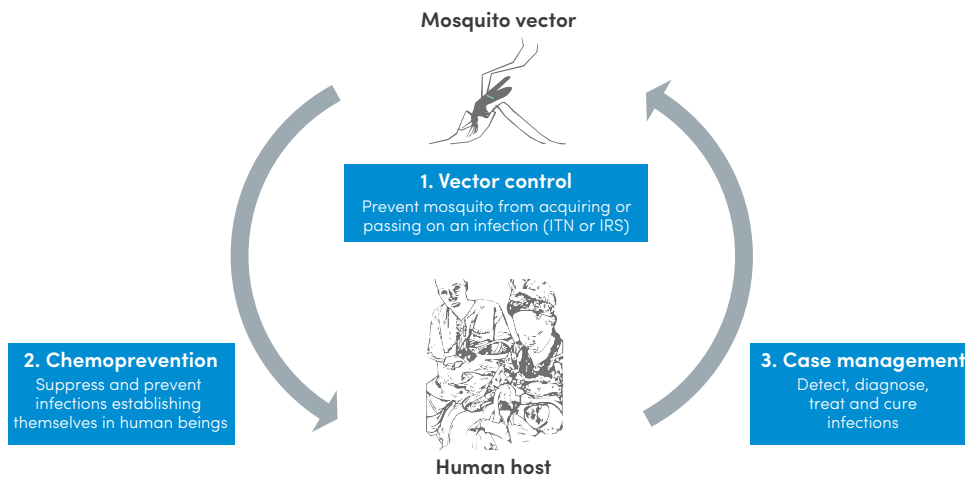


Figura 8 : Representação do racional das estratégias para prevenção e tratamento da malária (WHO, 2015c).

No Brasil, a rede pública de saúde tem sido orientada e estruturada pelas políticas de combate à doença para oferecerem diagnóstico e tratamento da malária à população. Há implantação de política de fiscalização para prevenção de transmissões indiretas como pela fiscalização das unidades de hemoterapia para triagem de parasitas no sangue, assim como é feito para doença de Chagas, HIV e hepatite viral (Figura 9).

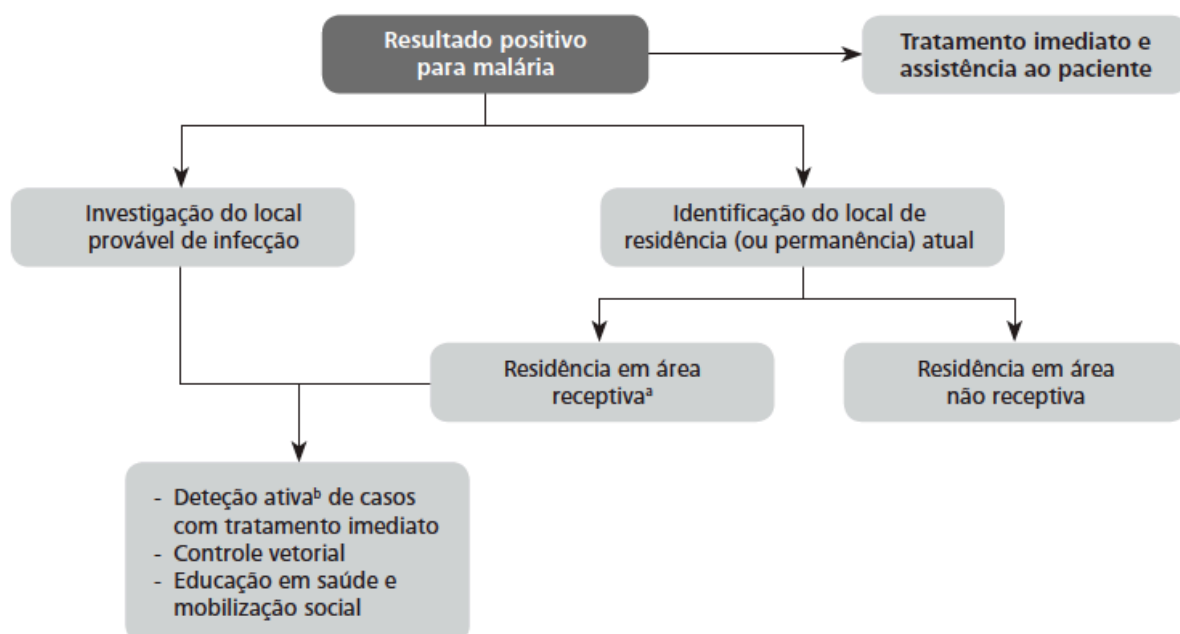


Figura 9 : Algoritmo utilizado por equipes de saúde médica para investigação de suspeito de malária (MS, 2014a).

Profissionais da saúde tem sido alertados quanto ao diagnóstico diferencial não só com febre hemorrágicas, mas também com relação a outras doenças. O diagnóstico diferencial leva em conta a suspeita de malária quando há suspeita de outras doenças (Figura 10) como dengue, esquistossomose, febre amarela, febre maculosa, febre tifoide, hantavirose, hepatite fulminante, leishmaniose visceral, leptospirose, rubéola, sífilis, meningite, cólera, Chikungunya e doença de Chagas.

Em caso de suspeita de malária, a rede de saúde brasileira segue o seguinte fluxograma:

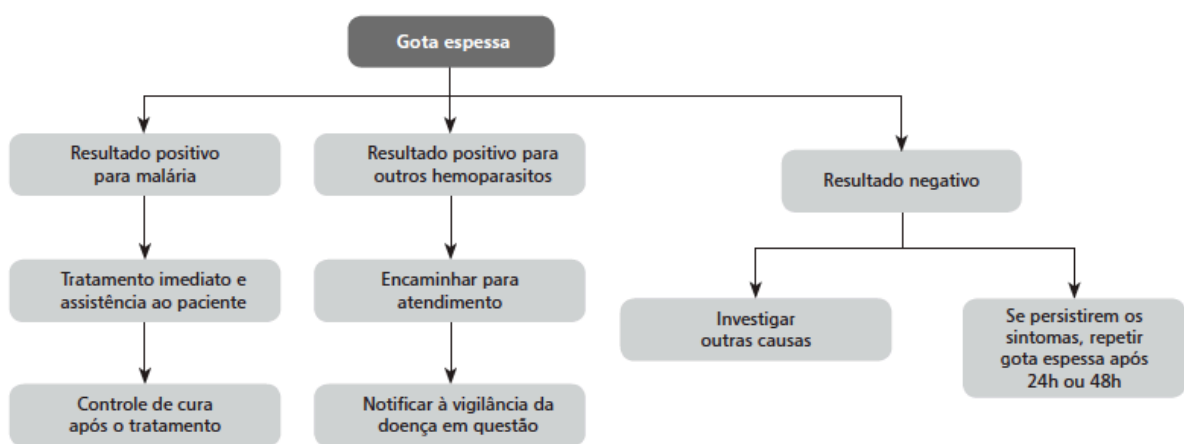


Figura 10 : Algoritmo recomendado pelo Guia de Vigilância em Saúde 2014 (MS, 2014a) para decisão após diagnóstico em malária de pacientes.

1.6. Agentes etiológicos e modo de transmissão

A malária epidêmica é uma doença de transmissão vetorial causada por agentes etiológicos do gênero *Plasmodium*, pertencente à seguinte taxonomia:

-*Eukaryota*
-*SAR*
-*Alveolata*;
Filo -*Apicomplexa*;
Classe -*Aconoidasida*;
Ordem -*Haemosporida*;
Família -*Plasmodiidae*;
Gênero -*Plasmodium*.

De acordo com a origem do plastídeo, o ancestral de todos Apicomplexa eram células fotossintetizantes (Cavalier-Smith, 1999; Keeling, 2009; Cavalier-Smith, 2010; Kalanon and McFadden, 2010). Importantes patógenos como *Eimeria spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Babesia bovis* e *Theileria annulata* (McFadden, 2014; Bartosova-Sojkova et al., 2015) estão dentre os organismos que possuem apicoplasto.

O gênero *Plasmodium* apresenta componentes celulares comuns a outros eucariotos como mitocôndria, núcleo, ribossomos, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi. Estruturas celulares particulares são o apicoplasto seguido do complexo apical, além de também apresentarem conoide, anel polar apical, micronema, exonemas, róptrias, grânulos densos e microtúbulos subpeliculares (Baum et al., 2006). O complexo apical, em particular, é que confere ao grupo atributos para o agrupamento *Apicomplexa* (Lim and McFadden, 2010).

O apicoplasto tem parte de seu genoma codificado no genoma nuclear (Foth and McFadden, 2003). Sua relevância se dá pelo seu papel na motilidade, na invasão do hospedeiro, no sequestro de grupo heme e na formação do vacúolo parasitóforo não fagossômico (Ralph et al., 2004; Baum et al., 2008; Lim and McFadden, 2010; van Dooren et al., 2012). Tem função de biossíntese de centros de ferro-enxofre, biossíntese do grupamento heme, biossíntese de ácidos graxos e biossíntese de terpenos (Foth and McFadden, 2003). Sua atividade de biossíntese é similar a de plastídeos, com processos do metabolismo constitutivo e vias metabólicas similares a de procariotos (Kalanon and McFadden, 2010).

Existem mais de 100 espécies no gênero *Plasmodium*, contudo, as espécies conhecidas como causadoras da malária no homem são restritas a cinco agentes etiológicos. Eles são: *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Destes, o *P. vivax* (84%) e *P. falciparum* (15%) são os principais causadores da moléstia no Brasil (WHO, 2015b). *P. malariae* foi descoberto por Laveran em 1881 e teve seu meio de transmissão revelado por Grassi e Faletti em 1890, assim como o *P. vivax* (Laveran, 1881b); *P. falciparum* foi reportado por Welch em 1897; *P. ovale* foi reportado por Stephens em 1922; e *P. knowlesi* foi reportado por Franchini em 1927 e nomeado por Sinton e Mulligan em 1932 (Sinton and Mulligan, 1932).

O mecanismo de infecção é similar entre as diferentes espécies de vetores e de agentes etiológicos. De forma geral, a transmissão pode ser subdividida em transmissão direta e transmissão indireta.

A transmissão indireta, ou induzida, pode ser decorrente de contaminações sanguíneas, como acidentes de manipulação de sangue contaminado ou seringas, ou por meio de transfusões, transplante de órgãos e transmissões congênitas. Contaminações indiretas acontecem em caráter excepcional e constituem pequena parcela dos casos de transmissão, não representando um perigo epidemiológico.

Na transmissão direta, a picada da fêmea do anófeles é responsável pelo desdobrar epidemiológico. Ela transmite para o homem a forma esporozóide do *Plasmodium* depositado em suas glândulas salivares. Quando injetados na pele pelo mosquito, esporozoítos tornam-se móveis e penetram em vasos sanguíneos, dos quais são transportados passivamente até sua destinação final: o fígado, onde iniciarão o ciclo hepático da doença. Uma parcela das células infectantes entra em vasos linfáticos e são drenados por linfonodos, onde são eliminadas pelas células imunitárias, e a grande maioria dos esporozoítos injetados permanece na pele. Estes são eliminados pelas células dendríticas ou penetram em células epiteliais e se diferenciam em merozóides (Figura 11) (Gueirard et al., 2010; Graewe et al., 2012).

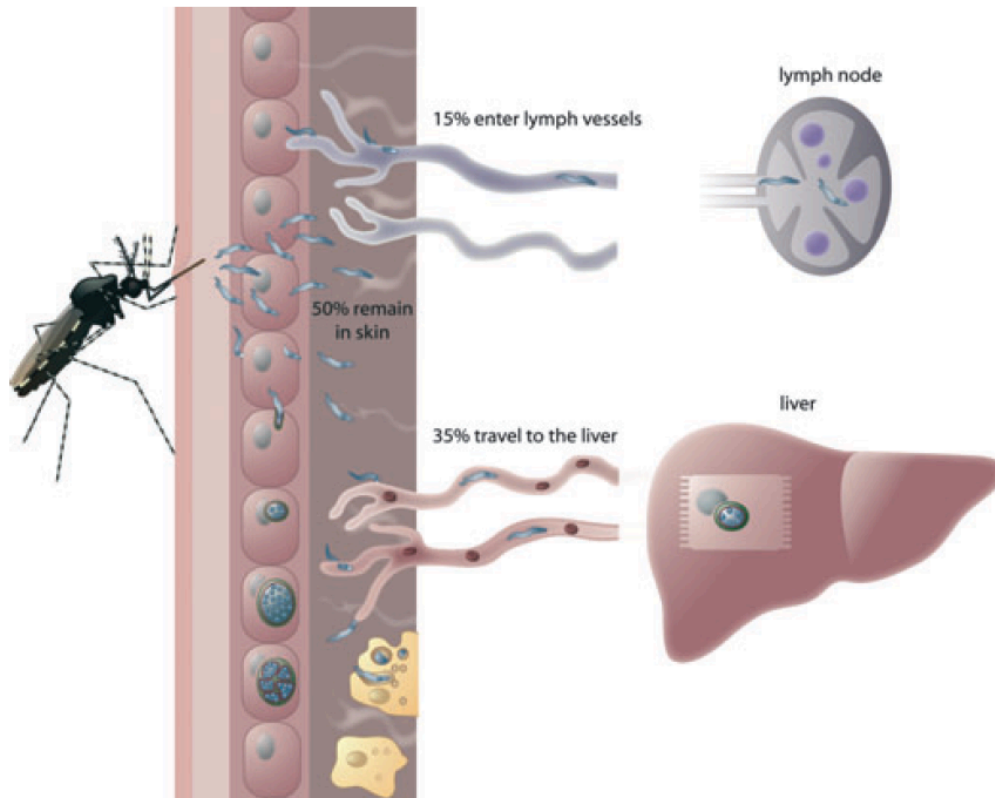


Figura 11 : Representação esquemática do transcurso da forma esporozoítio do parasita após transmissão pelo mosquito (Graewe et al., 2012).

A malária só pode ser transmitida ao homem por algumas espécies de mosquitos anofelinos que picaram um ser humano infectado, ingeriu gametócitos das espécies que tem o homem como hospedeiro e, depois que a forma esporozoítio encontra-se presente em suas glândulas salivares. No entanto, alguns casos onde há transmissão vetorial sem que tenha ocorrido o ciclo sexual tem sido estudados, a exemplo da transmissão já confirmada de macacos para homens através da forma assexuada do parasita transmitido pela picada do mosquito.

Além das espécies etiológicas já confirmadas como causadoras da malária humana, há a suspeita de contágio natural ou por zoonose por *P. brasilianum* (Contacos et al., 1963; Lalremruata et al., 2015; Rayner, 2015), por *P. inui* (Coatney et al., 1966), *P. cynomolgi*, *P. eylesi*, *P. schwetzi*, e *P. simium* (Ta et al., 2014).

1.7. Vetores transmissores e hospedeiros

Os vetores transmissores da malária são conhecidos popularmente no Brasil por “carapanã”, “muriçoca”, “sovela”, “mosquito-prego” e “bicuda”. A maioria das espécies tem dispersão nos entorno de seus sítios larvários (SUCEN, 2016).

Os transmissores são insetos *Diptera*, *Culicomorpha*, *Culicidae* e *Anopheles*. São mais de 430 espécies anofelinas conhecidas em todo o mundo, das quais 40 espécies são dotadas da capacidade vetorial em humanos.

De forma geral, os vetores são dependentes de fatores microclimáticos para sobrevivência como também no desenvolvimento de esporogonia em mosquitos infectados. Cada espécie tem suas preferências de criadores e podem responder de forma diversa da habitual quando sob pressão populacional. De forma generalizada, as diversas espécies utilizam-se de amplo espectro de criadouros que podem variar entre regiões e entre as estações climáticas e terem comportamentos distintos.

Para regiões de risco de malária, ao longo das diferentes estações do ano, podemos constatar como fatores microclimáticos e de pressão populacional dos mosquitos podem influenciar na probabilidade de contágio ao longo de tempo de permanência (Figura 12).

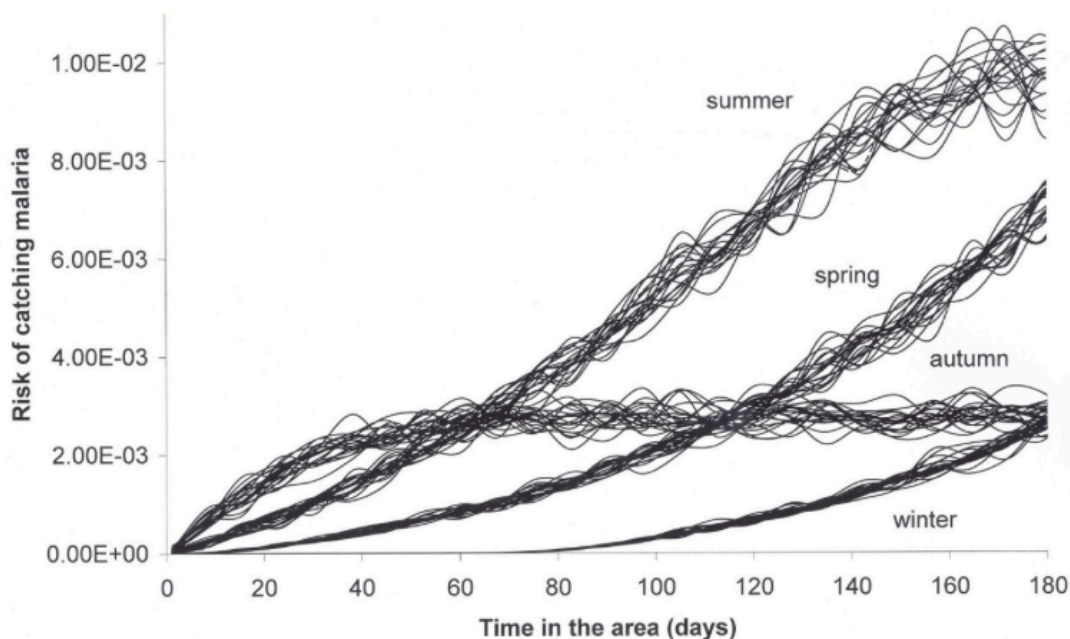


Figura 12 : Relação da probabilidade de contrair malária pela duração da exposição ao longo das diversas condições microclimáticas e variáveis populacionais dos mosquitos em cada estação do ano (Massad et al., 2009).

Quanto aos criadouros, os mosquitos podem ser fitotelmatas ou ocupar corpos d'água de grande volume ou pequenas depressões naturais e artificiais. Podem se desenvolver em diferentes tipos de solos: criadouros permanentes, semipermanentes ou temporários; expostos ao sol ou sobrados; com água salobra, semisalobra, ou pouco salobra; água turva ou água límpida; com vegetação emergente ou flutuante; ou com matéria orgânica abundante ou pouca matéria orgânica.

O conhecimento dos sítios larvários são importantes para medidas de controle e prevenção da doença. O controle do mosquito pode ser mediante a combinação do combate ao vetor adulto, pela borrifação da parede dos domicílios com inseticida de depósito; combate às larvas, por meio do uso de larvicidas, controle biológico por bacilos (*Bacillus turigiensis* e *Bacillus sphericus*) ou peixes larvófagos, e mosquitos transgênicos (McArthur et al., 2014); saneamento básico; melhoria das condições de habitação; e campanhas educativas para conhecimento de como a malária é transmitida, os meios de proteção e dos hábitos do mosquito transmissor (SUCEN, 2015).

No Brasil, ao menos 60 espécies anofelinas estão presentes. Contudo, a capacidade e competência vetorial, de importância epidemiológica para malária humana no Brasil, é restrita a 11 espécies:

- *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*. Root, 1926; Transmissor do *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, é o principal vetor de malária no Brasil. Hábito alimentar predominantemente antropofílico e endofágico. Estão presentes nas áreas com altitude abaixo de 1.000 metros. É capaz de manter a transmissão mesmo quando em baixa densidade populacional de mosquitos.
- *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*. Curry, 1932; é um anofelino pouco endofílico e as fêmeas costumam ser mais zoófilas que antropófilas.
- *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* s. l.; registrou o encontro de espécimes naturalmente infectados tanto para *P. vivax* quanto para *P. falciparum* Klein et al. (1991 a, b). dotado de certa endofilia, ou atração pelo domicílio humano.
- *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara*. Galvão & Damasceno, 1942;
- *Anopheles (Nyssorhynchus) janconnae*. Wilkerson & Sallum, 2009;
- *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* s. s. Rosa-Freitas & Deane, 1989;
- *Anopheles (Nyssorhynchus) deaneorum*. Rosa-Freitas, 1989;
- *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi*;
- *Anopheles (Kerteszia) cruzii*. Dyar & Knab, 1908;
- *Anopheles (Kerteszia) bellator*. Dyar & Knab, 1906
- *Anopheles (Kerteszia) homunculus*. Komp, 1937.

Dentre essas 11 espécies, podemos considerar cinco delas como as principais responsáveis pelos casos da doença: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *A. (Nyssorhynchus) albitarsis* lato senso, *A. (Nyssorhynchus) aquasalis*, *A. (Kerteszia) cruzii* e *A. (Kerteszia) bellator*.

Acredita-se que muitas espécies de anófeles sejam originárias da África e atravessaram o Oceano Atlântico por meio das rotas transatlânticas do comércio de escravos (Figura 13).

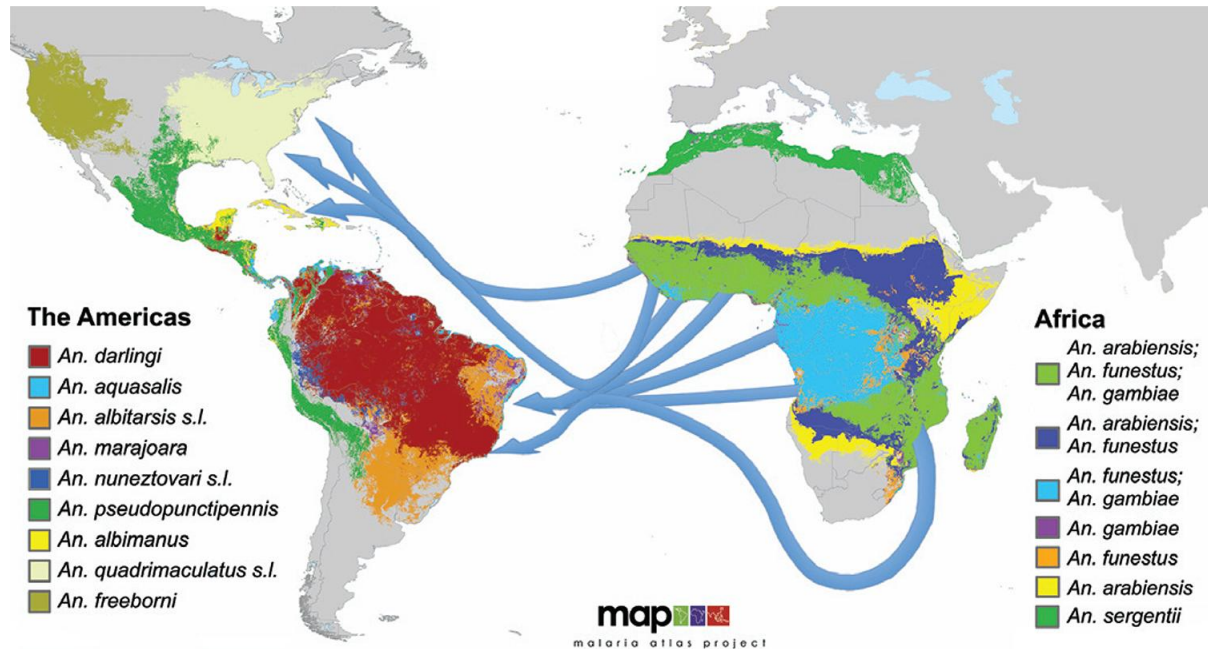


Figura 13 : Mapa das prováveis rotas transatlânticas da África para as América (Sinka et al., 2012).

A resistência a inseticidas tem se tornado uma barreira para o combate que pode ameaçar avanços obtidos na redução da incidência de casos da doença. Relatos de populações que se tornam resistentes a inseticidas vem aumentando a partir de 2010. Segundo a OMS (WHO, 2015c), de 78 países que fornecem dados de monitoramento das populações de mosquitos, 60 deles observaram resistência da população de vetores a ao menos um inseticida. Em 2014, a porcentagem de países que reportavam resistência a piretroide nos principais vetores alcançava cerca de 75% (Figura 14).

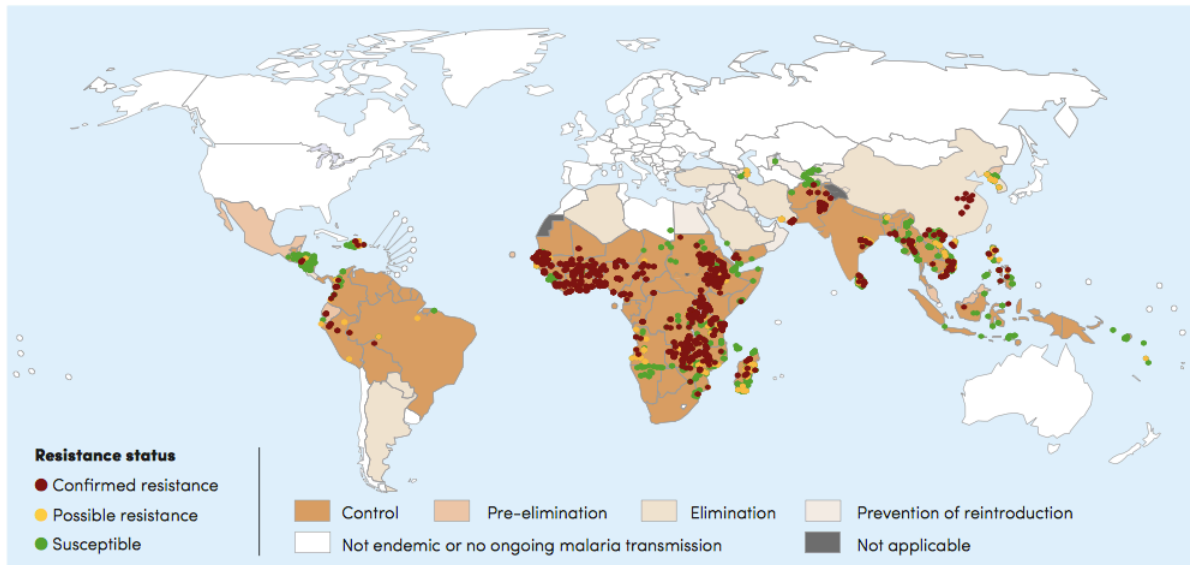


Figura 14 : Distribuição global dos casos de resistência a piretroide reportados até 2014 (WHO, 2015c).

É de conhecimento que a transmissão vetorial da malária decorre estritamente pela atividade de mosquitos *Anopheles*. Apesar disto, mosquitos da subfamília *Culicinae* como *Aedes spp.* e *Culex spp.* são objetos de estudo relacionados à malária, tendo em vista tanto o interesse na compreensão do desenvolvimento parcial de *Plasmodium* de mamíferos nesses mosquitos e na debelação da infecção destas formas infectantes pelo sistema imunitário destes mosquitos, como também por eles serem capazes de transmitir a malária aviária.

A plasticidade adaptativa de *Plasmodium* a novos vetores associado ao possível impacto da atividade antropogênica na natureza na promoção da adaptação de *Plasmodium* a *Culicinae* podem vir a implicar em novos fatores de risco epidemiológico (Molina-Cruz et al., 2013).

1.8. A biologia reprodutiva dos plasmódios

A biologia reprodutiva de *Plasmodium* spp é complexa, sendo composta por 3 etapas de vida haploides. Os ciclos envolvem interações moleculares tanto com o hospedeiro intermediário vertebrado como com o hospedeiro definitivo invertebrado.

De forma geral, as etapas do ciclo reprodutivo são diferenciadas em: sexuado, assexuado hepático e assexuado eritrocitário (Figura 15). O foco deste trabalho está na diferenciação celular de gametócitos do parasita, processo que normalmente ocorre dentro do mosquito, hospedeiro definitivo, e faz parte do ciclo sexuado. Por esta razão, discorreremos de forma mais superficial sobre os ciclos assexuados e com mais profundidade sobre o ciclo sexuado e a gametogênese.

Os ciclos de vida abarcam os estágios de vida do tipo esporozoítio (forma infecciosa invasiva dos hepatócitos), merozoítio (forma invasiva de eritrócitos), trofozoítio (estágios de diferenciação intra-eritrocitários) e gametócitos (estágio sexual).

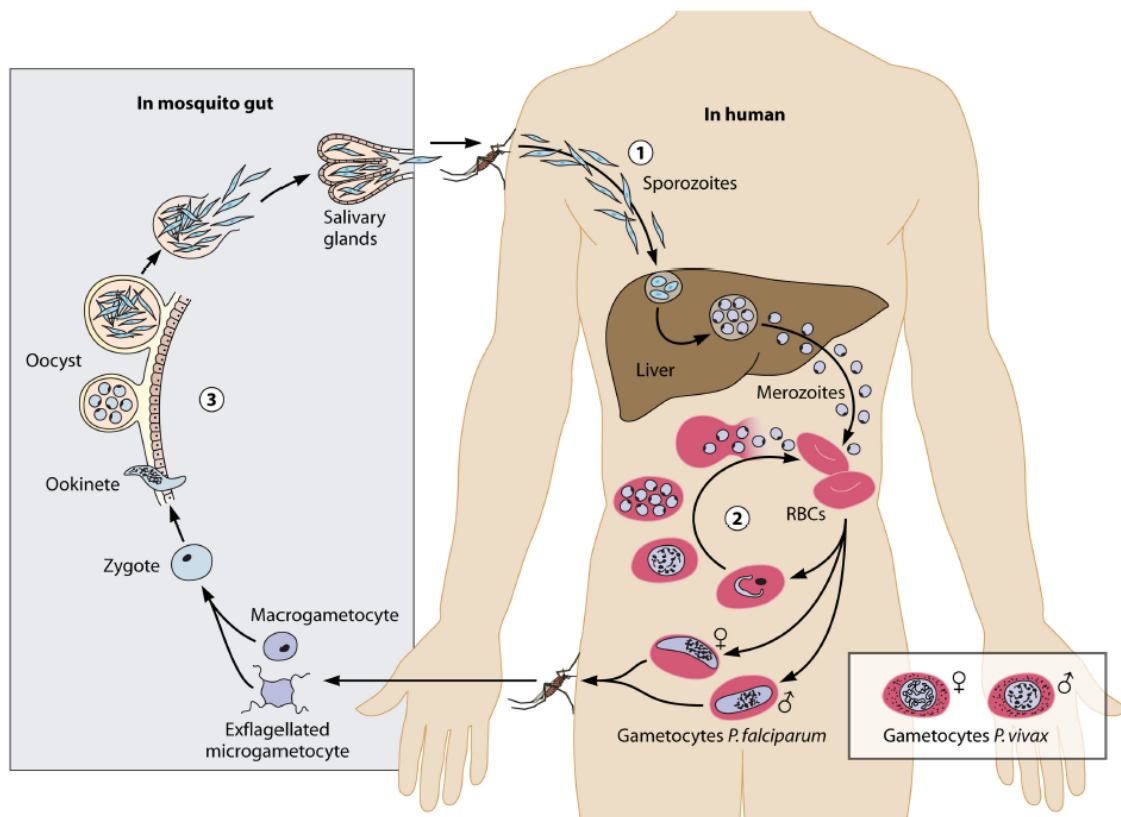


Figura 15 : Representação geral com os três ciclos de vida do gênero *Plasmodium* e a representação de dois de seus hospedeiros (Bousema and Drakeley, 2011).

1.8.1. Fase reprodutiva assexuada do *Plasmodium*

No ser humano, o parasita pode ser observado em duas fases: pré-eritrocitário transitório, ou hepático, e no ciclo intra-eritrocitário (Bannister and Mitchell, 2003). O último tem por finalidade a morfogênese da forma infectante: o merozoíto que se propaga na circulação sanguínea. É o ciclo intra-eritrocitário o responsável pelas manifestações clínicas mais importantes e pela evolução do quadro a morbimortalidade e ao óbito.

Com uma picada do mosquito, são inoculados no hospedeiro em média uma quantidade de 50 a 100 esporozoítos, uma forma haploide do parasita responsável pela infecção do hospedeiro vertebrado (Frischknecht et al., 2004; Medica and Sinnis, 2005). Cerca de 35% do total de esporozoítos inoculados conseguem adentrar no sistema circulatório do hospedeiro vertebrado (Amino et al., 2006; Graewe et al., 2012).

Até o final da década de 40, acreditava-se que esporozoítos principiavam a infecção malárica no sistema circulatório na invasão de eritrócitos. Sabe-se hoje que o ciclo de vida do parasita é mais complexo. Foi observado que a infecção inicia-se a partir da infecção de hepatócitos em um ciclo de vida anterior à infecção e ciclo eritrocitário (Fonseca et al., 1946; Bastianelli, 1948; Shortt and Garnham, 1948).

Adicionalmente, uma descoberta recente é de que as primeiras infecções maláricas acontecem ainda no epitélio do hospedeiro vertebrado após a picada do mosquito. Esporozoítos de *P. berghei* inoculados pelo mosquito adentram em células epiteliais e diferenciam-se em merozoítos (Gueirard et al., 2010). Contudo, o papel destes merozoítos no processo de infecção da doença ainda não foi compreendido e tampouco demonstrado para malárias humanas. A conclusão atual é de que, apesar de os esporozoítos infectarem outros tipos celulares, hepatócitos continuam a ser o principal tipo celular onde acontece o desenvolvimento inicial do parasita (Graewe et al., 2012; Sinnis et al., 2013).

Os esporozoítos que conseguem chegar ao fígado pela corrente sanguínea, ligam-se a proteoglicanos de sulfato de heparano e iniciam uma cascata de sinalização com proteína cinase 6 para que atravessem a barreira endotelial e alcancem os hepatócitos (Coppi et al., 2007). O mecanismo de invasão não é totalmente esclarecido e dois principais mecanismos propostos podem ser revistos em (Mota et al., 2001; Pradel and Frevet, 2001).

Nos hepatócitos, após a infecção pelos esporozoítos circulantes na corrente sanguínea, eles diferenciam-se em uma forma trofozoíto e em seguida realizam 14 sequências de multiplicação do DNA que produzirão sincícios, uma forma poliploide do parasita chamado de forma esquizonte (Jayabalasingham et al., 2010).

No esquizonte, ocorrerão as divisões mitóticas que darão origem a milhares de células haploides, os merozoítos, completamente funcionais, que iniciarão um outro ciclo de reprodução assexuado em eritrócitos e formarão uma massa crítica de células infectadas. Em humanos, esta diferenciação ocorre com cerca de 4 ou 5 dias, enquanto que em roedores ela se processa em 2 dias.

O ciclo reprodutivo em eritrócitos acontece com a invasão de eritrócitos por merozoítos de origem hepática ou de origem eritrocitária que encontram-se circulantes no sistema sanguíneo. Merozoítos invadem eritrócitos e diferenciam-se nos “estágio de anel” até o estágio trofozoítico, formas também haplóides (Figura 16). A citocinese e a síntese do DNA plastidial se completa com a divisão do esquizonte em diversos merozoítos que são liberados na circulação sanguínea com a ruptura da hemácia (van Dijk et al., 1997; Guttery et al., 2012b).

Ainda no ciclo eritrocitário, ocorre a gametocitogênese para a perpetuação do parasita em novo hospedeiro invertebrado através do ciclo reprodutivo sexuado. Alguns merozoítos se diferenciarão dentro de glóbulos vermelhos para dar origem a células gametocíticas.

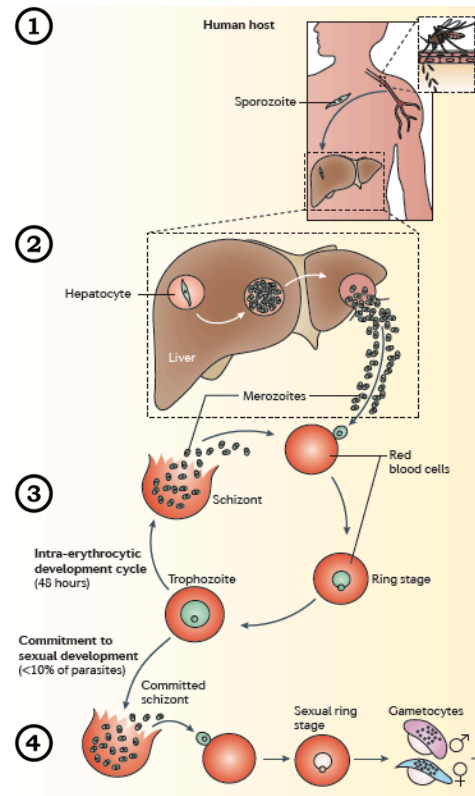
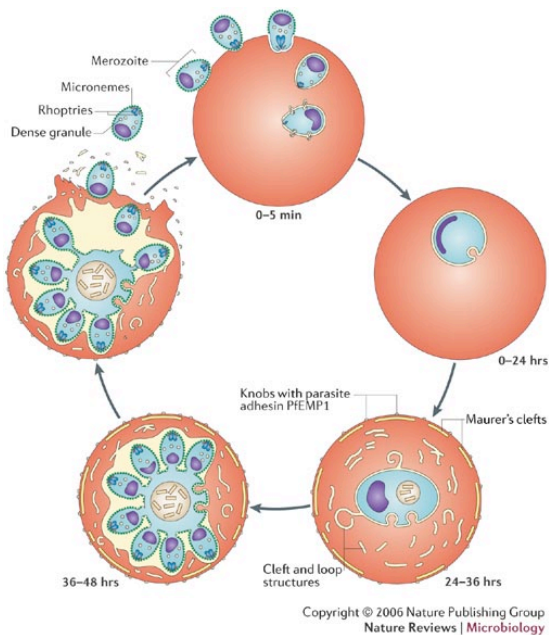


Figura 16 : A) Ciclo assexuado eritrocitário. B) Representação gráfica das etapas infecciosas do gênero *Plasmodium* no ser humano em sequência da picadura do mosquito. 1) infecção; 2) fase pré-eritrocitário; 3) formação de merozoítos no ciclo eritrocitário; e 4) gametocitogênese a partir do ciclo eritrocitário. Imagem modificada de (Guttery et al., 2012b).

1.8.2. Fase reprodutiva sexuada do *Plasmodium*

Após mais de 100 anos da descoberta do parasita, muitas etapas críticas dos mecanismos de infecção e do ciclo de vida sexuada do parasita estão sem respostas. Os mecanismos que desencadeiam a diferenciação de merozoítos em gametócitos não foram completamente elucidados (Bruce et al., 1990; Alano, 2014); tampouco foram os principais reguladores que levam à designação sexual dos gametócitos (Miao et al., 2010; Boisson et al., 2011).

Gametócitos são formas de vida haploides produzidas ao termo da gametocitogênese, pelo ciclo assexuado eritrocitário; são precursores dos gametas masculinos e femininos para a reprodução sexuada.

Fatores responsáveis pela decisão do parasita em produzir ou não gametócitos são mais conhecidos *in vitro* do que *in vivo* e não são necessariamente os mesmos fatores para ambos. Para experimentação *in vitro*, estresses ambientais como alta parasitemia, presença de sêrum e linfócitos, elevado número de reticulócitos, inibidores de síntese nucleica, hormônio de mamíferos e medicamento antimalárico servem de gatilho para a diferenciação de merozoítos em gametócitos ao longo do ciclo reprodutivo (Baker, 2010). Porém, para infecções *in vivo*, estes fatores não são obrigatoriamente os responsáveis pelo aumento da gametocitemia (Dunyo et al., 2006).

Acerca do gatilho para gametocitogênese e determinação de sexo, são merozoítos originados de uma mesmo esquizonte que, após nova infecção eritrocitária, darão origem a gametócitos de um mesmo sexo, e jamais uma mistura de sexos, ou então continuarão o desenvolvimento assexuado (Guttery et al., 2012b). O sexo dos gametócitos é determinado para todos os merozoítos de um esquizonte parental específico, ainda em uma rodada reprodutiva precedente à formação dos gametas no ciclo assexuado eritrocitário (Alano, 2007). Portanto, o sinal que determina o tipo de célula a ser formada reside na gênese do merozoíto no ciclo anterior (Bruce et al., 1990; Alano, 2014; Josling and Llinas, 2015).

O gênero parasitário não apresenta cromossomo sexual, mas genes sexuais (Janse and Water, 2004; Josling and Llinas, 2015). Para o *P. berghei*, por exemplo, cerca de 60-65% dos merozoítos darão origem a gametócitos femininos e 35-40% formarão gametócitos masculinos (van Dijk et al., 2001). Contudo, isto não significa que o número de gametas masculinos gerados sejam em menor número que gametas femininos. Com a replicação do DNA durante a exflagelação, o número de gametas masculinos pode potencialmente aumentar em 8 vezes, o que nos leva a um computo final da proporção sexual de cerca de 16-19% de gametas femininos e 84-81% de gametas masculinos.

Os mecanismos que levam os gametócitos a diferenciarem-se em gametas masculino e feminino *in vivo* ainda não são suficientemente claros, mas se é conhecido que fatores ambientais *in vitro* e fatores *in vivo* são gatilhos da diferenciação a gametas.

Gametócitos, em resposta a mudanças ambientais associadas à passagem do parasita do hospedeiro mamífero para o trato digestório do hospedeiro invertebrado, diferenciam-se em gametas (Billker et al., 1997; Billker et al., 1998).

1.8.2.1. Fertilização e proliferação no mosquito

Os gametócitos produzidos devem passar por etapas finais de desenvolvimento dentro dos eritrócitos na circulação sanguínea até tornarem-se competentes para a formação do zigoto quando ingeridos pelo mosquito (Figura 17).

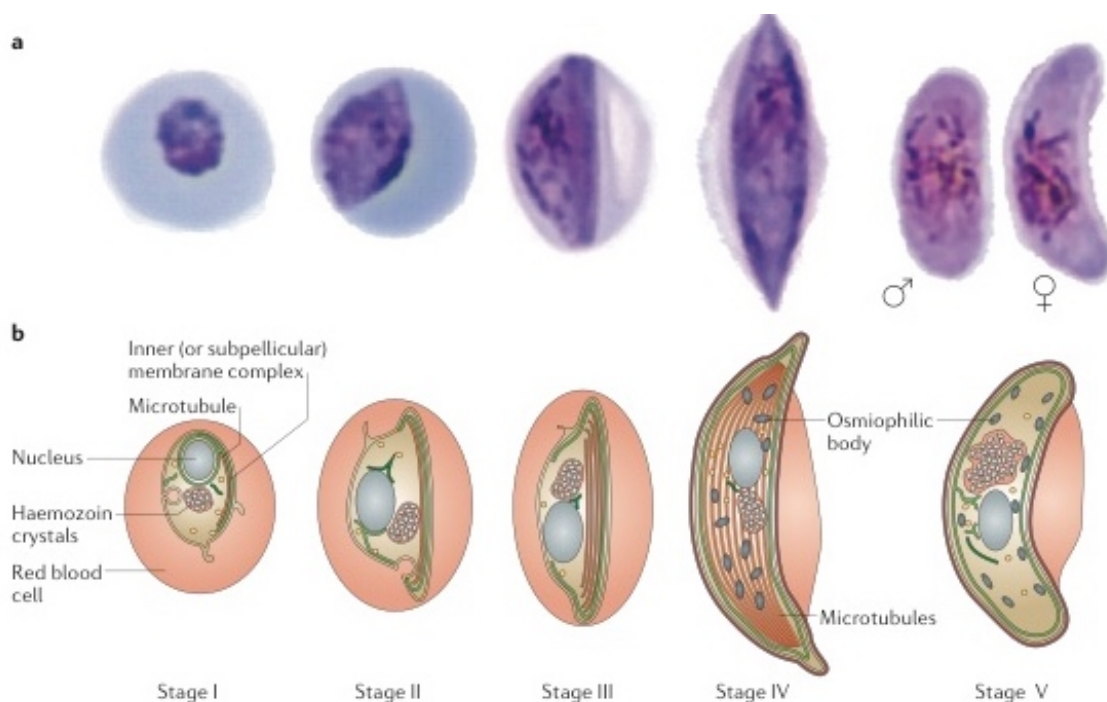


Figura 17: Cinco etapas de desenvolvimento de gametócitos de *P. falciparum* até a competência para fertilização (Josling and Llinas, 2015).

Ao picar um vertebrado, o mosquito ingere cerca de 2 μL de sangue (Vaughan et al., 1994), que contém milhares de formas assexuais e de gametócitos. As formas assexuadas são digeridas enquanto os gametócitos precisam se diferenciar para formação dos gametas, consumir a fecundação entre gametas para formar o zigoto, replicar o DNA para diferenciar-se em oocineto e evadir do lúmen do trato digestório do mosquito antes que sejam digeridos (Figura 18). Portanto, esse deve ser um processo rápido com vários ciclos de replicação de DNA, de meioses, de diferenciação celular e de migração no período do repasto do mosquito (Janse et al., 1986)

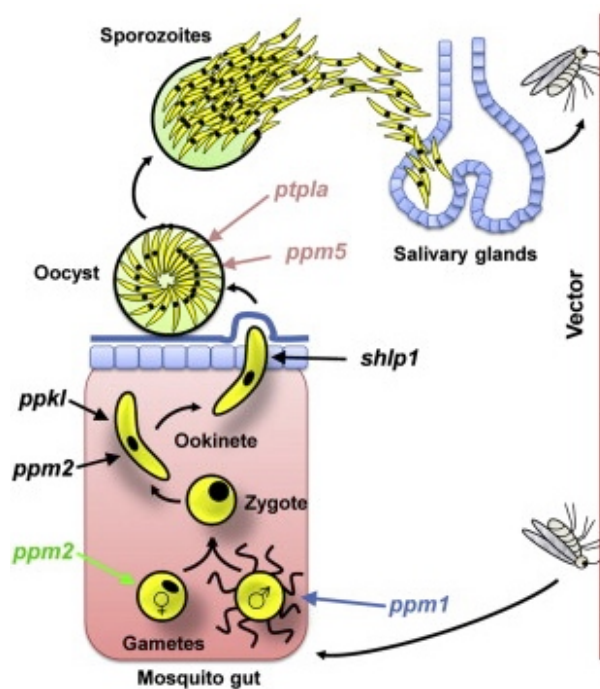


Figura 18: Ciclo parasitário sexuado representando a formação do zigoto, invasão do oocineto, desenvolvimento do oocisto e invasão das glândulas salivares (Guttery et al., 2014).

Gametas diferenciados são células haploides até a fecundação, quando então é formado o zigoto diploide. O zigoto diferencia-se em oocineto para colonização do mosquito (Lasonder et al., 2002), que migra e penetra no epitélio do trato digestório do mosquito para depositar-se sob a lamina basal do epitélio do trato digestório e encapsular-se, originando o oocisto poliploide (Sinden, 1999).

O oocisto é uma célula poliploide que realiza extensa replicação assexuada de milhares de esporozoítos. Quando a capsula do oocisto é rompida, esporozoítos imaturos são lançados na hemolínfa do inseto e ocupam passivamente toda a hemocele do mosquito (Sinden, 1999).

Para alcançar o desenvolvimento necessário para troca de hospedeiro, esporozoítos migram ativamente para glândulas salivares e ali permanecem até que estejam funcionalmente competentes (Ghosh and Jacobs-Lorena, 2013). Neste estágio de desenvolvimento, esporozoítos maduros migram para os ductos das glândulas salivares e ali permanecem para terem acesso ao próximo hospedeiro no momento da picadura do mosquito (Graewe et al., 2012).

Apesar de raros, para *P. vivax*, há relatos de formação de gametas ainda no sangue periférico do hospedeiro vertebrado, sem a troca do hospedeiro (Gerber et al., 1981; Tembhare et al., 2009; Prasad et al., 2011). São ignoradas quaisquer possíveis consequências da formação do zigoto no hospedeiro definitivo. Em contrapartida, existe volume crescente de trabalhos sobre o desenvolvimento do parasita no hospedeiro definitivo habitual.

1.9. Morfologia dos gametócitos

Os gametócitos iniciam sua maturação dentro de hemácias no sistema circulatório do hospedeiro vertebrado até alcançar a maturação final. A partir deste ajuste das competências, as células permanecem na circulação em um estado de inibição da diferenciação até serem ativados por estímulos específicos para tornarem-se gametas (Khan et al., 2005).

Em *P. falciparum*, esta maturação gametocítica acontece na maior parte do tempo na medula óssea (Aguilar et al., 2014) e pode ser dividida em cinco fases, as quais podem ser identificadas morfológicamente (Carter and Miller, 1979; Talman et al., 2004) como também por marcadores moleculares (Pradel, 2007).

A despeito das similaridades, há vantagens e desvantagens dos modelos animais para compreensão da malária. Por exemplo, quando comparamos o desenvolvimento de gametócitos de *P. falciparum* com o de *P. berghei*, constatamos diferenças tanto de morfologia, quanto de tempo de desenvolvimento e local de produção. Para fins comparativos, as constatações das semelhanças e dessemelhanças nos levam a concluir que *P. berghei* tem mais similaridades com outras malárias humanas e de primatas do que com o agente causador da malária falciforme.

Em *P. berghei*, as fases de amadurecimento gametocítico não são de fácil distinção por microscopia óptica e eletrônica. O gametócito não pode ser diferenciado de parasita na fase assexuada de trofozoítos por nenhuma técnica de microscopia até suas primeiras 18 horas. A partir deste momento, podem ser observadas estruturas sexo-específicas como distribuição pigmentar granulada no citoplasma, tamanho de célula e de núcleo aumentado, e de corpos osmiofílicos por microscopia eletrônica. Não é possível fazer qualquer distinção entre sexos por microscopia antes de 24 horas de desenvolvimento. Até o final do desenvolvimento, com cerca de 30 horas, é possível a observação de maior quantidade de corpos osmiofílicos em fêmeas (de Koning-Ward et al., 2008), quando comparadas com machos; o macho apresenta núcleo maior e irregular e menor contraste de coloração pela desmontagem de ribossomos (Figura 19).

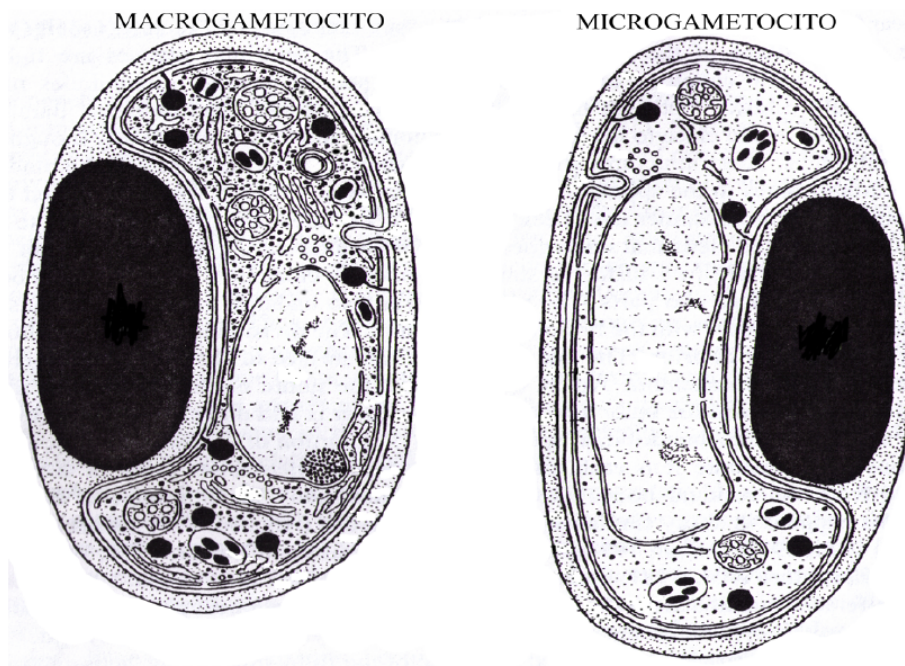


Figura 19 : Representação esquemática das estruturas celulares do macrogametócito e do microgametócito de *Plasmodium* infectante de aves com diferença do tamanho do núcleo e quantidade de ribossomos dentro de eritrócitos de aviários, de acordo com Carter, R. *et al* (Carter and Graves, 1989).

Ao término de cerca de 30 horas de desenvolvimento, gametócitos apresentam morfologia arredondada a ovalada com cerca de 15 μm de tamanho em *P. berghei*. Em *P. falciparum*, o tempo de desenvolvimento pode ser de 8-16 dias com microgametócitos com cerca de 16-25 μm (Janse and Water, 2004).

1.10. Diferenciação em gametas e exflagelação

É através da gametogênese que tanto gametócitos machos e fêmeas tornam-se células competentes, os gametas, para a fecundação, a formação de zigoto e a perpetuação reprodutiva do parasita por ciclo reprodutivo sexuado. Para *Plasmodium*, gametas masculinos e femininos são também chamados de microgametas e macrogametas.

Os microgametócitos são células mais simples que sua contraparte feminina (Janse and Water, 2004), e é por meio delas que o evento da gametogênese é mais facilmente observável até a formação dos gametas, tanto pelas profundas transformações morfológicas e moleculares como também como marcador de início dos estímulos ambientais que induzem a gametogênese. Trata-se de um desenvolvimento celular de breve duração, que se processa em cerca de 20 minutos após a ativação dos gametócitos no mosquito (Janse and Water, 2004).

A diferenciação dos gametócitos masculinos em microgametas é comumente referida por exflagelação. Este processo inicia-se pela percepção pelas células de abruptas modificações no ambiente circundante, desencadeando sinais para que a diferenciação se inicie.

Uma vez ativados, os gametócitos masculinos realizam rapidamente três rodadas de replicação do DNA, formando um núcleo octaplóide. Cada célula com núcleo poliplóide passa pela individualização do núcleo juntamente com a montagem intracelular de oito flagelos que, ao fim do processo de diferenciação, ou seja, após exflagelação dos mesmos, darão origem a oito gametas masculinos sexualmente competentes que fertilizarão gametas femininos (Figura 20).

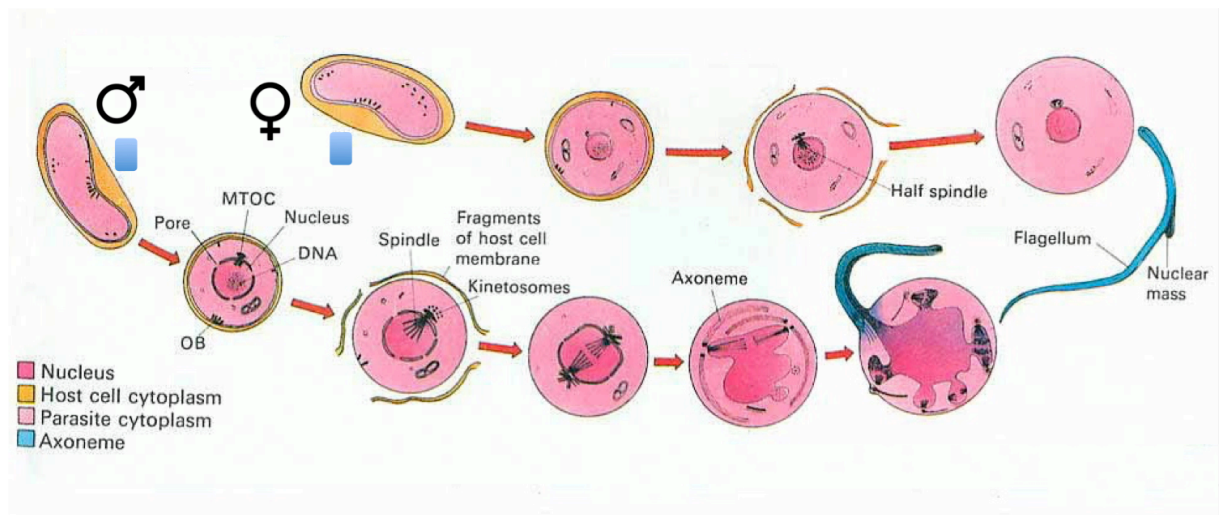


Figura 20 : Representação das etapas de ativação de gametócitos masculino e feminino de *P. falciparum*, seguido da formação de gametas (modificado de Trustees of the Wellcome Trust).

A atividade destes microgametas pode ser associada a dois momentos patentes: intenso movimento flagelar após formação dos mesmos, que irão realizar a etapa final da citocinese; e intenso movimento flagelar para fusão dos gametas masculino e feminino (Talman et al., 2014). Os eventos moleculares atrelados à ativação dos microgametócitos, ao irromper da exflagelação e à culminância de microgametas são quase que totalmente desconhecidos (Talman et al., 2014).

Sabe-se que existe um papel para o ácido xanturênico na ativação da gametogênese (Figura 21), apesar de não se ter conhecimento completo sobre o receptor deste estímulo. Foi observado que proteínas integrais de membrana, guanilil ciclases, poderiam ter envolvimento na ativação, contudo *P. berghei* nocauteado para estas proteínas foi capaz de produzir gametas funcionais (Hirai et al., 2006).

De estudos anteriores (Kawamoto et al., 1990; Kawamoto et al., 1993), existiam dados de que, com a ativação celular para gametogênese, existe aumento significativo do cálcio intracelular como também do cGMP. O aumento de cGMP recruta proteínas cinases dependentes de cGMP (McRobert et al., 2008), que, por sua vez, atuam sobre os mensageiros secundários diacilglicerol e inositol trifosfato (Martin et al., 1994) e levam à liberação e ao influxo de cálcio pelos retículos endoplasmáticos para o citosol celular. Esse, por sua vez, atuaria na ativação de enzimas e vias de sinalização celular, dentre elas as proteínas motoras

como as cinesinas para atuarem na reorganização celular e montagem do axonema neste novo contexto metabólico da célula.

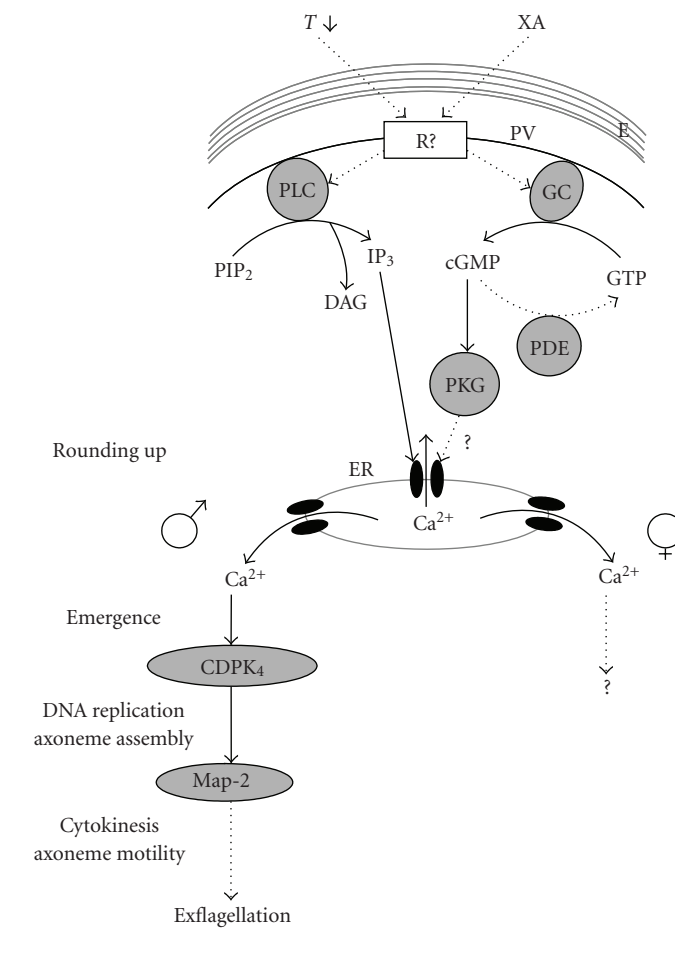


Figura 21: Visão global das vias de sinalização relacionadas à ativação da gametogênese em *Plasmodium* onde cálcio de retículo endoplasmático (ER) seria liberado após a atuação dos mensageiros secundários diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e desencadeariam cascatas de sinalização celular para ativação de vias metabólicas importantes para a gametogênese (Kuehn and Pradel, 2010).

Sem embargo, os elementos ambientais percebidos pelos gametócitos que são associados a sua ativação são conhecidos pela experimentação prática de culturas celulares. Uma abrupta mudança no ambiente, similar às mudanças presentes na troca de hospedeiros, servem como estímulo para ativação de cascatas de sinalização. Foram elencados um conjunto de variações que podem ser: 1) alterações de temperatura ambiental; 2) aumento de pH; 3) presença do ácido xanturênico, encontrado no trato digestório do mosquito; 4) concentração de sais divalentes; 5) outros compostos orgânicos (Gerber et al., 1981; Billker et al.,

1998;Billker et al., 2004;Tembhare et al., 2009;Baker, 2010). Contudo, para que haja eficiência de estimulação, a combinação de dois fatores são desejáveis: queda da temperatura e presença de ácido xanturênico a pH entre 7,8 e 8,2 *in vitro* (Billker et al., 1998).

Tanto o microgametócito como o microgameta precisam responder rapidamente às necessidades funcionais enquanto encontram-se no lúmen do trato digestório do mosquito antes que sejam digeridos. Por esta razão, o gametócito masculino maduro é uma célula com reduzida quantidade de ribossomos e de retículos endoplasmáticos, quando comparado com o gametócito feminino, para transcrição e tradução reduzida ao limiar que permita a sua sobrevivência. A célula concentra sua maquinaria para realizar sua função de gerar oito gametas masculinos. O evento de replicação de DNA na exflagelação é considerado um dos mais rápidos conhecido entre eucariotas (Janse et al., 1988).

Assim como microgametócitos apresentam maquinaria celular mínima suficiente para executar sua função, gametas masculinos também são células mais simples. De fato, constituem umas das células mais simples dentre os eucariotos (Talman et al., 2014). Em termos de dimensões, um microgametócito tem cerca de 15 μm (Janse and Water, 2004) e um microgameta apresenta cerca de 0,28 μm (Talman et al., 2014). Nos microgametas, são reconhecidas poucas estruturas celulares como núcleo haploide, um axonema ligado a um corpo basal modificado e uma membrana plasmática (Sinden et al., 1978). Ele não possui mitocôndria (Okamoto et al., 2009) e a forma que ele produz suficiente ATP para prover seus batimentos flagelares é desconhecida (Talman et al., 2014).

1.11. Malária de roedores – *Plasmodium berghei*

Há 40 anos, em 1976, foi estabelecida pela primeira vez uma cultura de células contínua de *Plasmodium* de humanos (Trager and Jensen, 2005) e de *P. berghei* de roedores em 1985 (Mons et al., 1985; Ramaiya et al., 1987). Até então, as culturas eram de curta duração ou em modelos biológicos animais (Freire, 1892). A otimização das técnicas de cultivo permitiu que grupos de pesquisa lançassem mão de estudos que ampliassem o conhecimento sobre a biologia da malária.

De forma similar, o desenvolvimento de tecnologia de cultivo celular em modelos animais avança o conhecimento da biologia dos parasitas humanos em perspectivas de estudos que ainda não podem ser endereçadas a técnicas *in vitro*.

Não obstante, o estudo dos parasitas da malária humana pelo expediente de parasitas de roedores são oportunos para avançar o conhecimento sobre biologia do desenvolvimento de parasitas da malária, interações parasito-hospedeiro, desenvolvimento de vacinas e testes de drogas. Cuidadosa avaliação dos resultados de modelos de roedores é essencial para avaliar a sua relevância para a doença humana.

Na malária humana, causada por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*, frequentemente se é empregado *Plasmodium berghei* como modelo biológico. As similaridades estão em nível fenotípico e na biologia (Sanni et al., 2002), como na gametocitogênese, ativação de gameta, exflagelação, fertilização, formação do zigoto, formação de oocineto (Guttery et al., 2012b), sincronização, taxa de síntese do DNA e momento de replicação do material genético extra-nuclear (van Dijk et al., 1997).

P. berghei foi provavelmente visualizado pela primeira vez há pouco mais de 70 anos, em 1943, por Vincke, pela observação de esporozoítos em glândulas salivares (Landau and Boulard, 2012; Vanderberg and Gwadz, 2014) e, em 1946, por esfregaços de sangue do estômago de mosquitos *Anopheles dureni millescamps*, seu hospedeiro invertebrado na natureza (Sinden et al., 2002). *Grammomys surdaster*, uma espécie de roedor encontrado na floresta próxima à cidade de Kisanga, no país de Catanga, é seu hospedeiro vertebrado (Bafort et al., 1968; Sinden et al., 2002).

Esse organismo propicia um modelo atraente para a pesquisa sobre malária, pois é capaz de produzir em laboratório todas as formas sexuadas e assexuadas, o que permite uma infinidade de estudos e a comparação dos dados *in vivo* e *in vitro* (Sanni et al., 2002; Briquet et al., 2015). O organismo é utilizado em rotina por laboratórios e projetos de pesquisa, o que aproxima alguns padrões de comparação entre estudos. Podem ser usados vetores particulares de diversas regiões do mundo (Tabela 1). Seu genoma, mitocondrial e do apicoplasto, já foi sequenciado.

Tabela 1: Relação de mosquitos com capacidade vetorial e mosquitos sem capacidade para transmissão de *P. berghei* (Sinden et al., 2002).

Com Capacidade Vetorial	Sem Capacidade Vetorial
<i>An. dureni</i>	<i>Culex bitaeneorhynchus</i>
<i>An. stephensi mysorensis</i>	<i>Ae. aegypti*</i>
<i>An. gambiae</i>	<i>An. aztecus</i>
<i>An. atroparvus</i>	<i>An. concolor</i>
<i>An. quadrumaculotus</i>	<i>An. coustani</i> var <i>ziemanni</i>
<i>An. maculipennis</i>	<i>An. fluviatilis</i>
<i>An. albimanus</i>	<i>An. funestus</i>
	<i>An. hyrcanus</i>
	<i>An. jamesi</i>
	<i>An. pulcherrimus</i>
	<i>An. splendidus</i>
	<i>An. subpictus</i>

* – produz até o oocisto da linhagem SP28 S. Keiberg.

Não obstante as possibilidades de abordagens de pesquisa e a base de conhecimento já construída sobre a doença em humanos e sobre *Plasmodium berghei*, o emprego do modelo para estudo das malárias é oportuno pela existência e disponibilidade de linhagens de camundongos susceptíveis, geneticamente definidos e nocauteados (Janse et al., 2006).

Existem clones de *P. berghei* bem caracterizados, com fenótipos particulares como para expressão de proteínas fluorescentes (Natarajan et al., 2001; Franke-Fayard et al., 2004) ou pela incapacidade de gerar estágios sexuais.

Algumas linhagens de *P. berghei* isoladas desconhecidas são K173, ANKA, LUKA, SP11 e NK65 (Sinden et al., 2002). Este trabalho utiliza-se da linhagem *P. berghei* NK-65 e do banco de dados da linhagem ANKA.

A designação NK-65 tem origem de “New York-Kisanga 1965”. Este é o nome em que consta local do isolamento, local de origem e data do isolamento. A linhagem foi isolada em 1965 a partir de mosquitos *Anopheles durenii*, infectados por *P. berghei*, capturados na floresta de Kisanga, em Catanga, e enviados pelo pesquisador belga, Josef Maria Bafort. O plasmódio foi isolado e replicado na Escola Medica da Universidade de Nova Iorque (Vanderberg and Gwadz, 2014).

P. berghei ANKA foram também capturados por Bafort e Vincke na floresta de Kasapa, próxima de Lubumbashi, na data de Março de 1965. A designação advem de obtidos de mosquitos coletados na floresta de Antwerp-Kasapa. O plasmódio foi isolado e replicado no *Prince Leopold Institute of Tropical Medicine Antwerp* em Antwerp (Vincke and Bafort, 1968; Vanderberg and Gwadz, 2014).

P. berghei tem por ponto forte a plasticidade para manipulações genéticas para estudo da malária humana e um rápido ciclo de vida para maturação e diferenciação das formas sexuais (Guttery et al., 2012b). Ciclos reprodutivos do *P. berghei* são de curta duração quando comparados com de outras espécies plasmodiais, incluindo o *P. falciparum*. Todas fases de desenvolvimento no roedor hospedeiro permanecem circulantes no sangue.

Em laboratórios, a fase sexual de *P. berghei* é com frequência realizada em mosquitos *An. stephensi*. Esporozoítos tornam-se maduros na glândula dos mosquitos com cerca de 13 a 14 dias após a infecção do mosquito e tem tamanho médio de 11 a 12 μm .

A fase do fígado é de curta duração. Ela se inicia com no mínimo 3 h após infecção (Frevert et al., 2005), para que suceda a infecção de hepatócitos, e transcorre por cerca de 50 horas para que conclua o ciclo assexuado hepático. Este ciclo culmina com a formação de formas esquizontes com o máximo de 30 μm que liberarão merozoítos para a próxima fase reprodutiva (Killick-Kendrick, 2012).

Ao fim do ciclo hepático, merozoítos são liberados no sistema circulatório e infectarão hemácias e, preferencialmente, reticulócitos de roedores hospedeiros (Rénia et al., 2012). Os

ciclos assexuados eritrocitários têm duração aproximada de 24 horas sem sequestração tecidual. Os gametócitos são formados a partir de ciclos assexuados eritrocitários.

Algo próximo de 20% de merozoítos de cada ciclo assexuado eritrocitário dão origem a gametócitos (Jambou et al., 2011). O tempo de desenvolvimento dos gametócitos até se tornarem maduros é de cerca de 30 horas. Ao término de seu desenvolvimento, as células apresentarão um tamanho de 15 μm (Garnham, 1965) e fase de crescimento G0 até serem ingeridas ou ocorrer a morte do hospedeiro (Sinden, 2012).

Após ingestão e ativação dos gametócitos por mosquitos, a diferenciação celular em gametas finda em aproximadamente 15 minutos e, portanto, o plasmódio encontra-se competente para a fertilização do zigoto. O zigoto, com cerca de 12 μm , replica seu DNA e diferencia-se em uma célula móvel e tetraploide de cerca de 12 μm (Garnham, 1965).

Para que a infecção tenha êxito com ao menos um oocisto, deverão ser formados entre 40-140 oocinetos (Sinden et al., 2007). A transição de oocineto para oocisto depende da densidade do primeiro, da resposta imunológica do mosquito (Sinden et al., 2007), de variáveis fisiológicas, bióticas e genóticas dos organismos (Christophides et al., 2002; Lambrechts et al., 2005; Dong et al., 2006). Contudo, uma vez que o desenvolvimento de oocineto para oocisto tenha sucesso, ele acontecerá em média dentro de 18 a 24 horas.

Um oocisto maduro tem média de tamanho de 45 μm (Killick-Kendrick, 2012) e libera uma média de 2000 esporozoítos imaturos por oocisto na hemocele do mosquito (Stone et al., 2013) em cerca de 18 dias após a infecção (Stone et al., 2013). Dentre os esporozoítos liberados em *An. gambiae* e *An. stephensi*, cerca de 20-60% (Hillyer et al., 2007; Stone et al., 2013) são capazes de invadir glândulas salivares após 8 horas de sua liberação pelo oocisto (Hillyer et al., 2007). O paradeiro dos esporozoítos que não conseguiram invadir é desconhecido; sabe-se apenas que 2% sofrem fagocitose, morte e degradação celular (Hillyer et al., 2007).

1.12. Cinesinas

1.12.1. As cinesinas em eucariotos

A literatura sobre a malária traz informações de que um grupo de proteínas, dentre elas as proteínas motoras, desempenham papel crítico em todos os passos de desenvolvimento do parasita (Gerald et al., 2011). O estudo de proteínas motoras relacionadas ao processo de formação do flagelo e exflagelação é desejável para conhecimento mais pleno sobre o desenvolvimento dos estágios sexuais para transmissão da doença (Arevalo-Herrera et al., 2011; Guttery et al., 2012b; Sinden et al., 2012; Josling and Llinas, 2015).

As proteínas motoras formam 3 grandes superfamílias, que são: miosinas, cinesinas e dineínas (Wickstead and Gull, 2006; Kardon and Vale, 2009). Destas, a superfamília das cinesinas são codificadas pelo genoma de todos os eucariotas (Wickstead and Gull, 2006) e, para gametócitos de *P. berghei*, há indícios de que elas podem desempenhar um papel essencial na regulação do flagelo (Talman et al., 2014). Cinesinas são hierarquizadas atualmente em 14 famílias, cinesina 1 a cinesina 14, de acordo com características do domínio motor da enzima (Lawrence et al., 2004) (Figura 22). Quando fazem parte da mesma família, normalmente apresentam funções similares no reino animal, apesar de nem todas enzimas de mesma família apresentarem funções análogas (Tomei and Wolniak, 2016). Somente as proteínas da família das cinesinas 5 tem papel conservado na formação do fuso mitótico tanto em plantas como em animais (Tomei and Wolniak, 2016).

As cinesinas estão relacionadas a uma variedade de processos em cílios e flagelos (Fox et al., 1994). Elas desempenham papéis estruturais e funcionais (Fox et al., 1994) durante suas atuações na mitose, na ciliogênese (Yokoyama et al., 2004; Tomei and Wolniak, 2016) e na atividade ordenada de flagelos de *Chlamydomonas* (Fox et al., 1994). A ciliogênese é sujeita a regulação pelas cinesinas em organismos do reino animal como vegetal (Tomei and Wolniak, 2016) e sua ausência tem sido associada a defeitos na montagem do axonema tanto em cílios sensoriais como em cílios de locomoção (Yokoyama et al., 2004). São também importantes na regulação de processos essenciais da gametogênese masculina em gametófitos (Tomei and Wolniak, 2016) como também para a fecundação dos gametas em *Chlamydomonas* (Fox et al., 1994).

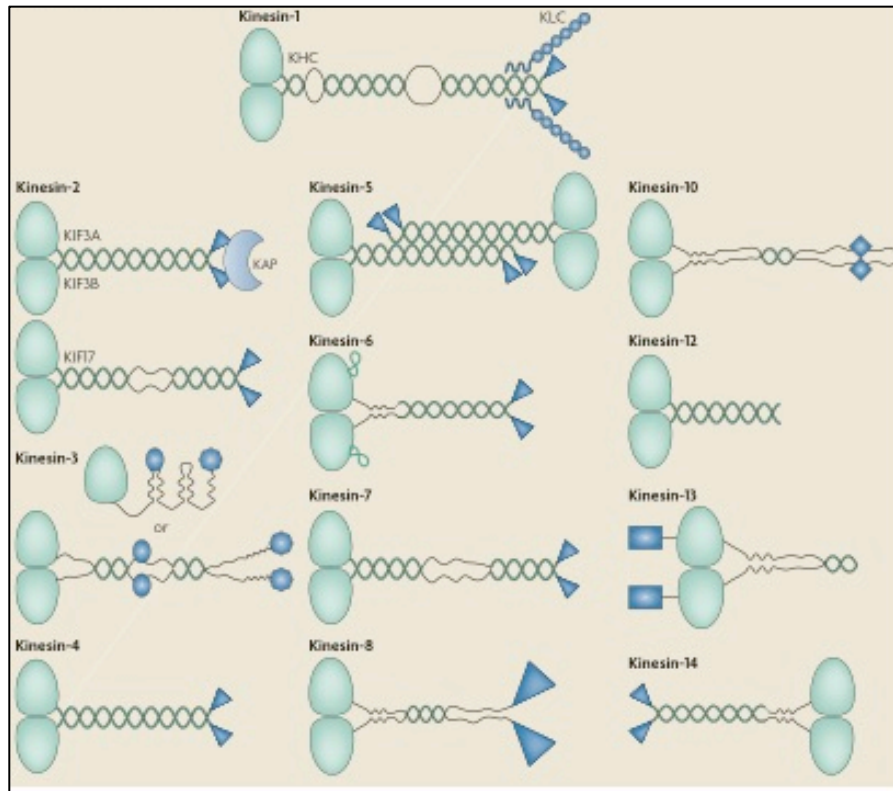


Figura 22 : Representação esquemática das cinesinas de algumas famílias onde pode-se observar domínio motor conservado e diversidade de domínio variável entre famílias de cinesina (Verhey and Hammond, 2009).

Cinesinas fazem o transporte de cargas (Yokoyama et al., 2004; Kevenaar et al., 2016), como vesículas, cromossomos ou outras partículas (Hirokawa and Noda, 2008), a organização espacial de organelas e controlam a dinâmica de microtúbulos tanto em axônios como em dendritos de células nervosas (Kevenaar et al., 2016). Assim, cinesinas fazem o transporte intraflagelar dirigido ao longo de axonemas de microtúbulos, responsável pelo movimento de componentes axonemais para a montagem da extremidade distal de flagelos (Fox et al., 1994).

Além disto, em flagelos de *Chlamydomonas reinhardtii*, o par central de microtúbulos é revestido por um conjunto de proteínas associadas e, possivelmente, não deixam qualquer superfície livre no axonema para um movimento progressivo de cinesina, o que indica que cinesinas no par central de microtúbulos de flagelos não atuam propriamente como proteínas motoras típicas (Yokoyama et al., 2004).

De forma geral, cinesinas podem ser empregadas de diversas formas pelas células eucarióticas, como na organização de microtúbulos em geral, nas interações de microtúbulos

corticais, na transferência de sub-compartimentos celulares, na distribuição mitocondrial, na dinâmica do cinetócoro, na morfogênese de fuso e no alinhamento cromossômico (Gupta et al., 2006; Messin and Millar, 2014; Shin et al., 2015; Kevenaar et al., 2016), no transporte intracelular, na segregação de organelas, desestabilizando microtúbulos, na alteração da morfologia, ou mesmo no movimento de toda a célula (Wickstead and Gull, 2006).

1.12.2. A motilidade das cinesinas

Cinesinas usam a energia proveniente da hidrólise do ATP para se deslocarem ao longo do microtúbulo no sentido da extremidade positiva. O domínio motor é altamente conservado e compreende um núcleo catalítico de ATP e um sítio de ligação de microtúbulos (Tomei and Wolniak, 2016).

Ademais do domínio motor, há um domínio variável em cauda que é importante para a ligação de vesículas de transporte (Tomei and Wolniak, 2016) (Figura 23). As regiões de domínio variável são responsáveis pela interação específica da proteína, conferindo diferentes funções às cinesinas (Tomei and Wolniak, 2016).

A maioria das cinesinas atuam como homodímeros, embora existam heterodímeros, heterotrímeros e oligomerizados que se conectam através do motivo hélice-hélice das proteínas (Tomei and Wolniak, 2016).

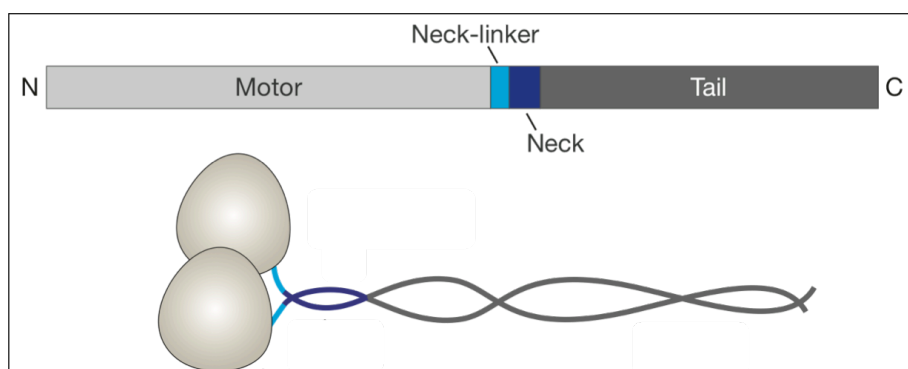


Figura 23 : Representação esquemática da estrutura da cinesina 8 com seus domínios motores e variável e sua forma dimérica. Modificado de (Roostalu and Surrey, 2013).

1.12.3. Regulação de cinesinas

Cinesinas são reguladas por 3 mecanismos: 1) interações cauda-cargas de transporte, 2) interações motor-microtúbulos e 3) autoinibitórios pela interação motor-cauda (Kevenaar et al., 2016). Outros mecanismos relacionados à regulação das cinesinas ainda são desconhecidos.

A ausência de cargas de transporte ligada à cinesina faz com que ela assuma uma conformação enovelada (Kevenaar et al., 2016). Com o enovelamento, o domínio variável da cauda interage com o domínio motor e inibe sua atividade motora (Kevenaar et al., 2016). Por outro lado, quando há ligação de carga de transporte ao domínio variável, a autoinibição é interrompida pela alteração conformacional da enzima e, como consequência, o movimento torna-se possível pelas atividades do domínio motor (Kevenaar et al., 2016).

A atividade motora das cinesinas também são inibidas quando proteínas ligadoras de cinesinas se associam ao domínio motor. Elas impedem a ligação das cinesinas com os microtúbulos e, desta forma, modulam as atividades de motilidade e despolimerização de cinesinas em microtúbulos (Kevenaar et al., 2016). De outro modo, microtúbulos e tubulina não polimerizada podem ativar a atividade motora de cinesina 8 (Gupta et al., 2006).

1.12.4. A cinesina 8 em *Plasmodium*

Neste trabalho, empregamos uma linhagem de *P. berghei* mutante para cinesina 8 com o objetivo de estudar a diferenciação do gametócito macho ao microgameta, único estágio do gênero *Plasmodium* em que os flagelos estão presentes. São investigados mecanismos compensatórios ou regulatórios relacionados à mutação da cinesina 8 que justifiquem as alterações fenotípicas observadas e os mecanismos chave de atuação da cinesina 8 no desenvolvimento gametocítico normal. O propósito do uso do mutante foi, portanto, de ampliar a compreensão e o discurso sobre mecanismos críticos que permitam interferências e interrupção da gametogênese.

A Cinesina 8 é uma família de enzimas motoras ditas ultraprocessivas que regulam a atuação de microtúbulos em seu deslocamento em direção à “extremidade mais” (*plus end*)

para atuar na desorganização, despolimerização ou recuperação da extremidade do microtúbulo (Messin and Millar, 2014;Gergely et al., 2016). Desta forma, elas regulam o comprimento de microtúbulos em diferentes compartimentos celulares e ao longo de diferentes etapas do ciclo biológico (Messin and Millar, 2014;Gergely et al., 2016).

Sua dissociação da extremidade positiva dos microtúbulos é pouco frequente, o que faz com que elas sejam enriquecidas nestas extremidades positivas de forma diretamente relacionada ao comprimento dos microtúbulos e, desta forma, promovam a pausa ou ruína dos arranjos de tubulinas alfa e beta na extremidade mais de microtúbulos (Gupta et al., 2006;Shin et al., 2015).

Microtúbulos apresentam polaridade e sentido de crescimento de acordo com a disposição dos monômeros de tubulina alfa e beta. Alfa tubulinas dão a orientação “*minus end*” e beta tubulinas dão a orientação “*plus end*”, onde as tubulinas alfa e beta são adicionadas para o crescimento de microtúbulos (Messin and Millar, 2014) (Figura 24).

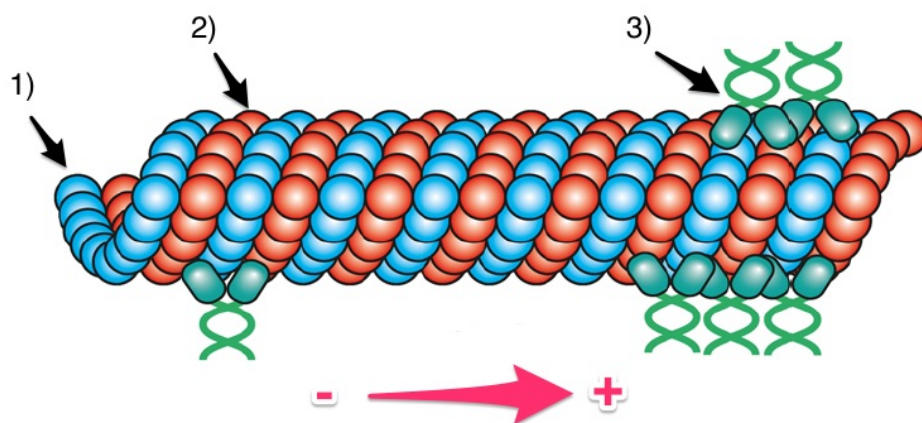


Figura 24 : Imagem modificada de Messin *et. al.* (Messin and Millar, 2014). A seta representa o sentido de deslocamento da cinesina 8, que se concentra na extremidade positiva (*plus end*), sobre as unidades alfa e beta de tubulina, que formam o microtúbulo. Representados em 1) unidade de tubulina alfa (em azul); 2) unidade de tubulina beta (em vermelho); 3) unidades de cinesina 8 (em verde).

A família cinesina-8 tem sido reportada em atividades implicadas na dinâmica de microtúbulos nas múltiplas respostas celulares como: no aumento ou redução da velocidade de crescimento celular, na frequência de recuperação, na parada de ciclo celular, na nucleação, na dimerização de tubulina, na formação de anel tubulina, na ligação cruzada de microtúbulos e nodeslizamento de microtúbulos (Gergely et al., 2016).

São ditas ultraprocessivas devido, possivelmente, à atuação de um segundo sítio de ligação de microtúbulos que conecta domínios motores ao carril de microtúbulos, apesar de haver contestação quanto à eficiência de processividade (Shin et al., 2015).

A grande diversidade de atuação das cinesinas 8 na dinâmica de microtúbulos trouxe algumas explicações sobre os distintas atuações desta família para diferentes organismos eucarióticos (Gupta et al., 2006;Gergely et al., 2016). Contudo, ainda não está totalmente esclarecido como cinesina 8 contribui para movimentos organizados de cromossomos na performance do fuso mitótico no alinhamento com o plano de divisão celular (Gupta et al., 2006;Stumpff et al., 2008;Gergely et al., 2016), na dinâmica dos cinetócoros (Gupta et al., 2006;Stumpff et al., 2008), no controle das oscilações cromossômicas (Stumpff et al., 2008), na regulação do comprimento de microtúbulos ligados ao córtex celular, para interações microtubulocortical, na distribuição mitocondrial (Gupta et al., 2006) ou na formação dos flagelos em gametócitos e subsequente exflagelação.

Em humanos, observou-se que a cinesina 8 é acumulada em um gradiente de concentração (Messin and Millar, 2014) ao longo de microtúbulos cinetócoros de uma maneira dependente da sua atividade motora (Stumpff et al., 2008). Em leveduras, a atividade ATPásica indispensável para função motora é ativada por dímeros de tubulina (Gupta et al., 2006). Na regulação de microtúbulos, quando ligada a ATP, a cinesina 8 forma um complexo com a tubulina não polimerizada que pode provocar a intermitência ou a despolimerização de microtúbulos (Gupta et al., 2006).

Observou-se que a ausência de cinesina 8 em organismos mutantes é a causa de defeitos na polaridade celular e de fusos mitóticos mais longos (Gupta et al., 2006;Messin and Millar, 2014), mas que isto não é um padrão obedecido em todos organismos (Messin and Millar, 2014;Gergely et al., 2016).

Neste trabalho, aspiramos enriquecer o conhecimento sobre as relações dos componentes proteicos e mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento ontogenético de gametócitos na formação de gametas e o papel que cabe à cinesina 8 no desempenho de sua função molecular.

1.12.5. A cinesina 8 em *Plasmodium berghei*

O genoma do *P. berghei* codifica duas proteínas cinesina 8. Uma delas é codificada no cromossomo 8 do *P. berghei*, gene PbANKA_08_v3, para proteína de massa molecular de 161.603 Da, ponto isoelétrico de 9,38, sob número de registro no banco de dados GeneDB: PBANKA_0805900 (banco de dados NCBI PB000348.03.0). A outra cinesina 8, alvo deste estudo e enunciada ao longo deste trabalho, está codificada no cromossomo 2, gene PbANKA_02_v3, sob número de registro no GeneDB como PBANKA_0202700 (banco de dados NCBI PB001397.02.0) com massa molecular de 168.815 Da e ponto isoelétrico de 6,52.

Até o presente, não houve detecção de cinesina 8 em fêmeas da linhagem NK65, tanto nos estágios do ciclo assexuados como em macrogametócitos e macrogametas. De acordo com comunicação pessoal dos professores Philippe Grellier e Delphine Depoix, a partir de trabalhos em desenvolvimento pelo grupo de pesquisa, a cinesina 8, que faz parte do âmagão deste trabalho (PBANKA_0202700), não é encontrada expressa em fêmeas de *P. berghei*. Se expressa em macrogametócitos, não pode ser detectada pelas técnicas pelas quais foi investigada, como por imunocitocalização, por anticorpos para microscopia eletrônica, por microscopia de fluorescência confocal, ou mesmo pela espectrometria de massas.

Ainda de acordo com trabalhos do Prof. Grellier, por microscopia de fluorescência foi observada uma construção transgênica do plasmódio em que a cinesina 8 foi expressa acoplada à sequência de Proteína Verde Fluorescente, conhecida por GFP (*green fluorescent protein*). A fluorescência de kin8-GFP ocorreu somente em algumas células, as quais eram coincidentes com células masculinas que fluoresciam pela marcação de alfa tubulina II, utilizada como marcador específico do sexo masculino em gametócitos de *P. berghei* (Khan et al., 2005).

Após 15 minutos da indução da exflagelação, possivelmente o microgameta realiza todos os três ciclos de replicação de DNA e em seguida o condensa, mas não é capaz de cumprir com a separação dos cromossomos e formação de gametas individualizados. As microscopias eletrônica (Figura 25) e de fluorescência revelam que, em organismos mutantes, os núcleos não se individualizam e as duplas de microtúbulos dos axonemas se forma de forma desorganizada, não chegando, portanto, a constituir a estrutura flagelar do tipo 9 + 2 normal do selvagem (Figura 25-D).

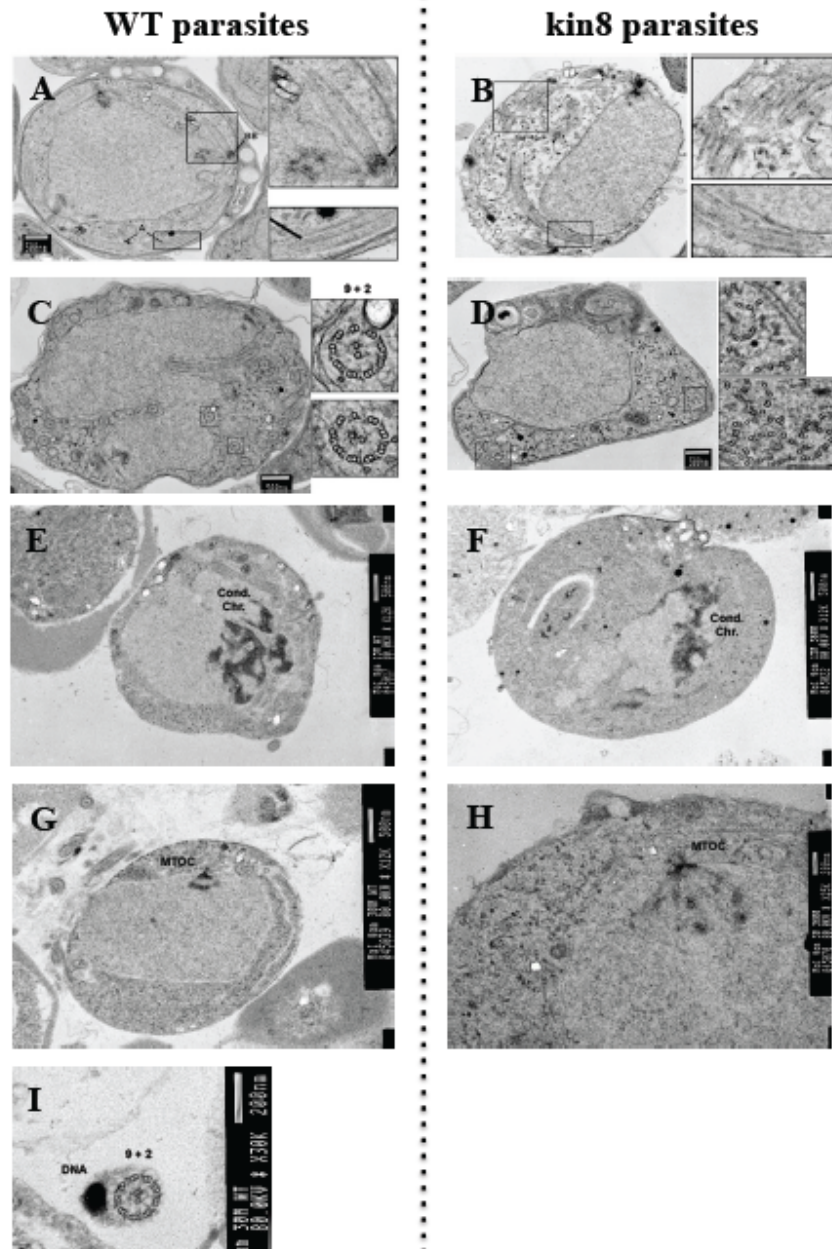


Figura 25 : Fenótipo dos parasitas mutantes comparado com o selvagem por microscopia eletrônica de gametócitos machos aos 15 min da indução das diferenciação celular. Todas as figuras correspondem ao parasita ao 15 min após a ativação, exceto a figura H, onde temos 30 min transcorridos após ativação. Para o mutante, não houve a formação de microgametas nem eventos de exflagelação. Pode ser observada desorganização do axonema, possivelmente decorrente da montagem dos microtúbulos, e incapacidade de exflagelação em *P. berghei* mutante para cinesina 8. C) organismo selvagem em corte transversal com ampliação de axonemas à direita, estrutura dos axonemas em 9 + 2. D) Organismo mutante em corte transversal com detalhe à direita, estrutura dos axonemas desarranjada. Dados gentilmente fornecidos pelo grupo dos professores P. Grellier/ D. Depoix. Captura de imagem pelo Dr. David Ferguson. (BB: Basal body; A: Axoneme; Cond. chr.: condensed chromatin; MTOC: microtubule-organizing center). Escala de barras de 200 nm ou 500 nm.

Nos gametócitos machos, a cinesina 8 pode ser encontrada nos flagelos e de forma difusa no citoplasma celular, o que é um indicativo de que também esteja associada a outros processos celulares não relacionados a formação do flagelo e exflagelação, como tráfego intracelular e outras funções das cinesinas descritas acima.

Se associada a tubulinas e formação de microtúbulos, conforme discutido ao longo deste trabalho, há a possibilidade de que a ausência da cinesina 8 poderia afetar, nas fêmeas, somente a classe funcional de microtúbulos subpeliculares, enquanto que, no macho, possivelmente afetaria as três principais classes funcionais em que os microtúbulos estão associados em plasmódio (Sinden, 1982; Schwank et al., 2010):

- microtúbulos de axonemas, importantes para locomoção e fecundação;
- microtúbulos de fusos mitóticos, que atuam na segregação cromossômica e divisão celular;
- microtúbulos subpeliculares, importantes para o arranjo das estrutural da célula (Bell, 1998).

Devido ao pequeno número de cinesinas em plasmódio quando comparado a outros organismos eucariotos (Chung et al., 2009), hipotetiza-se que cinesinas de *Plasmodium* podem ter atividade ampliada a variados processos dentro da célula.

1.13. Proteômica e proteoma de *Plasmodium*

A proteômica é uma área da ciência que, em muitas das vezes, utiliza-se de abordagem científica não clássica (Kell and Oliver, 2004). Ou seja, a metodologia científica pode ser dirigida pela descoberta, ou a formulação de hipóteses pode ser feita ao final da observação indutiva dos fenômenos da natureza. Apesar de esta metodologia apresentar-se como uma nova abordagem, ela também é utilizada pelas ciências “ômicas”, como genômica, transcriptômica, metabolômica. Por vezes, essa metodologia tem seu valor para a biotecnologia e para a ciência reivindicado no meio científico (Marincola, 2007). Contudo, essa metodologia empregada pela proteômica (Aebersold et al., 2000) não é uma novidade das “ômicas” e remonta de tempos remotos da ciência para fornecer arcabouço de informações para importantes hipóteses e teorias (Casadevall and Fang, 2008). A proteômica pode auxiliar a elucidar mecanismos moleculares dos sistemas biológicos e, portanto, o método científico é muitas vezes apenas um método de fazer descobertas (Feynman, 2005).

No presente momento, a proteômica compreende o conjunto de técnicas utilizadas para investigar misturas complexas de proteínas e determinar suas relações em um contexto funcional e de expressão gênica em determinada condição fisiológica de interesse. O uso de técnicas diversas nos estudos das proteínas permite a determinação da identidade de proteínas, quantificação, localização, caracterização e quantificação de modificações pré-, co- e pós-traducionais e determinação de interações e mecanismos de sinalização celular do maior número possível de proteínas, o que torna esse campo interdisciplinar e versátil de forma a abarcar questões complexas características dos sistemas biológicos e para a formulação de hipóteses.

A descoberta e descrição do conjunto de proteínas presentes em determinada célula, tecido ou fluido corporal em dado momento fisiológico, para um genoma designado, o proteoma (Olsen et al., 2006), e de importância para o funcionamento saudável de um ente vivo faz das proteínas de longe a maior classe de alvos medicamentosos (Kumar and Mann, 2009). A identificação de moléculas axiais do parasita e do hospedeiro nas etapas da infecção são capitais para compreensão e intervenção nos mecanismos que acarretam a patogenicidade.

Ao final da década de 90, iniciou-se o sequenciamento genômico dos primeiros organismos responsáveis pela malária (Carlton et al., 2002; Gardner et al., 2002). Portanto,

subsequentes investigações proteômicas sobre a malária só viriam a se acentuar no princípio da década seguinte. Trabalhos pioneiros para elucidar o proteoma tiveram início em 1987 através de 2D-SDS-PAGE (Pinswasdi et al., 1987).

Os trabalhos de proteômica, subsequentes ao sequenciamento genômico dos organismos, permitiram vislumbrar mecanismos de regulação da expressão proteica e de evasão ao sistema imune do hospedeiro (Florens et al., 2002a; Lasonder et al., 2002). A maioria destes estudos proteômicos tratam da compreensão de mecanismos do ciclo intraerocitário, tanto pelo provimento de amostra como por esta ser a fase mais patogênica para o ser humano.

Os trabalhos de proteômica com *Plasmodium* se concentram principalmente nas formas dos estágios assexuados, nos quais é apresentado o quadro sintomático da doença e em que estão concentrados a maior parte dos estudos sobre a biologia do parasita. Contudo, diferentes estágios de gametócitos foram caracterizados por análises de proteômica, que detectaram aumento de proteínas específicas de gametócitos ao longo do desenvolvimento (Florens et al., 2002a; Lasonder et al., 2002), assim como também estudos em *P. berghei* no desenvolvimento de gametas (Khan et al., 2005; Talman et al., 2014; Alonso-Morales et al., 2015).

Talman *et al.* aponta que o metabolismo energético de gametas masculinos é sustentado fundamentalmente pela glicólise devido à ausência de mitocôndrias como também pela detecção reprodutível de todas as enzimas da via glicolítica e do transportador de hexose. Neste estudo, foram identificadas 615 proteínas por espectrometria de massas acoplada à técnica de fracionamento de proteínas por MudPit (Talman et al., 2014).

Foi investigado em Khan *et al.* a composição de cinases e fosfatases no proteoma de gametócitos e as implicações de proteínas sexo-específicas como mitogen-activated protein kinase 2 (MAP2) e NIMA-related kinase (NEK4) ao separar gametócitos machos e fêmeas por citometria de fluxo. As cinases MAP são frequentemente relacionadas à proliferação e diferenciação de células. Neste estudo, foram encontradas 779 proteínas em *P. berghei* (Khan et al., 2005).

Em Tao *et al.*, foram identificadas 1703 proteínas em gametócitos de *P. falciparum* e, por reanálise de dados obtidos em trabalho de Khan et al. (Khan et al., 2005) com *P.*

berghei, foram identificadas 1128 e 1180 proteínas de gametócitos masculinos e femininos, respectivamente (Tao et al., 2014a).

Mais recentemente, Alonso-Morales e colaboradores (Alonso-Morales et al., 2015), ao trabalhar com técnica de eletroforese bidimensional para fracionamento de proteínas e identificação por espectrometria de massas, detectou um somatório aproximado de 710 *spots* na faixa de massa de 20-20 kDa e pI de 3-10 a partir de todos géis produzidos. Suas identificações foram restritas a 23 fosfoproteínas a partir de *P. berghei* no marco de 15 minutos de diferenciação do gametócito e em comparação com gametócito não estimulado.

1.14. Fosfoproteoma de *Plasmodium*

Os mecanismos de sinalização e regulação em processos celulares, como o da gametogênese em plasmódio, são dirigidos por “núcleos executivos” (Kumar and Mann, 2009) formados por proteínas, os principais efetores das funções biológicas (Cox and Mann, 2007).

Os níveis de expressão de todas as proteínas expressas por um sistema podem fornecer dados relevantes para a caracterização de um sistema biológico e seu funcionamento. A atuação concertada das proteínas em determinado organismo vivo depende não somente da composição deste conjunto de proteínas, mas também de outras variáveis como os mecanismos de regulação por modificações pós-traducionais (Cox and Mann, 2007).

As fosforilações figuram entre os tipos de modificações pós-traducionais mais comuns (Pandey et al., 2014) nas regulações dos mecanismos celulares em eucariotos (Alonso-Morales et al., 2015; Panichakul et al., 2015). Estima-se que de 10 a 30% de todas proteínas de um organismo eucariótico sejam reguladas por fosforilação (Weise and Lenz, 2008; Wu et al., 2009).

Este tipo de regulação celular confere a um organismo a capacidade de respostas rápidas e reversíveis ao nível molecular frente às condições ambientais cambiantes (Chung et al., 2009), e de regular temporal e espacialmente algumas proteínas (Dastidar et al., 2013). Desta forma, permite ao parasita uma pronta alteração de sua biologia (Bautista et al., 2014; Lasonder et al., 2015) para uma melhor adaptabilidade às condições ambientais circundantes, como para escapar da resposta imunológica do hospedeiro, se desenvolver e, portanto, perpetuar-se (Chung et al., 2009; Bautista et al., 2014).

O balanço de atividades antagonistas relacionadas às fosforilações são controladas por duas classes de proteínas: proteínas cinases e proteínas fosfatases, que realizam respectivamente a fosforilação e desfosforilação de proteínas (Pandey et al., 2014).

Para a atividade de proteínas cinases, as fosforilações envolvem esterificação reversível do grupo fosfato em determinados resíduos de aminoácidos. Reações catalisadas por proteínas cinases acontecem com a transferência de grupo fosforil ao custo de um ATP para um hidroxiaminoácido (Chung et al., 2009).

Para atividade de fosfatases, o grupo fosfato é hidrolisado da ligação fosfoéster do resíduo de aminoácido modificado. O resultado é a liberação de um íon fosfato livre, deixando somente o grupo hidroxila do resíduo previamente fosforilado (Sickmann and Meyer, 2001).

As fosforilações e desfosforilações acontecem predominantemente em resíduos de serina e treonina, mas também podem acontecer com menor frequência em resíduos de tirosina e histidina (Hanks, 2003). As fosforilações modificam as propriedades físico-químicas das proteínas e, desta forma, podem resultar em alterações moleculares particulares, como dobramentos proteicos próprios, atividade de microtúbulos, atividade de histonas, regulação de fatores de transcrição, alteração de atividade enzimática, afinidade de interações com outras proteínas, alocação subcelular de proteínas ou tempo de residência (Wu et al., 2009; Eyrich et al., 2011).

A consequência global proporcionada por um conjunto de fosforilações e desfosforilações para os organismos está muita vez na regulação direta de processos do ciclo celular (Solyakov et al., 2011) e na transdução de sinais. A transdução de sinal em metazoários regula praticamente todos os aspectos da função biológica celular, como comunicação intercelular, replicação de DNA, transcrição, metabolismo e crescimento, diferenciação celular, ativação de receptores, organização citoesquelética, remodelação da cromatina e apoptose (Doerig et al., 2008; Chung et al., 2009; Hilger et al., 2009; Thingholm et al., 2009; Solyakov et al., 2011; Pandey et al., 2014), como também processos especializados e críticos do parasita como na invasão de eritrócitos e citoaderência (Wu et al., 2009).

Os efeitos das fosforilações diferenciais são observados nas mudanças funcionais na biologia do parasita (Lasonder et al., 2015) e podem ocorrer em múltiplos sítios de uma mesma proteína. A consequência de um sistema de múltiplos níveis de regulação é um controle ajustado de funções celulares e respostas a estímulos (Wu et al., 2009).

Proteínas cinases, fosfatases e vias de transdução de sinais são as responsáveis pela orquestração regulatória por fosforilações em diversas proteínas (Solyakov et al., 2011; Lasonder et al., 2015), como nas proteínas chaperonas, que são reguladas por fosforilação para o dobramento orientado de proteínas ou desdobramento para translocação, complexação ou degradação de proteínas (Wu et al., 2009).

Estima-se que mais de 50% das proteínas do proteoma do plasmódio sejam proteínas estágio específicas (Bautista et al., 2014). Isto indica substancial grau de especialização molecular do parasita a cada estágio de seu ciclo celular (Bautista et al., 2014), mas também a necessidade de mecanismos regulatórios eficazes especializados para cada circunstância metabólica celular. Além da fosforilação do parasita, temos que a infecção por *P. falciparum* acarreta em um aumento drástico das fosforilações dos eritrócitos (Wu et al., 2009), o que é uma evidência quanto à relevância das fosforilações também na regulação do hospedeiro como também em uma possível implicação nas interações parasita-hospedeiro.

Nos plasmódios, as proteínas fosforiladas são predominantemente intracelulares e poucas delas localizam-se na superfície membranar do parasita (Lasonder et al., 2012). Análises por interrupção gênica apontam que metade das proteínas fosfatases de *P. berghei* são críticas para o correto funcionamento celular (Pandey et al., 2014).

Em eucariotos, o número de proteínas fosfatases é relativamente pequeno quando comparado ao de proteínas cinases. Apesar disto, proteínas reguladoras de fosfatases atuam na mediação da atividade de fosforilase e, desta forma, trazem à tona a hipótese de que a quantidade de complexos de fosfatases e proteínas mediadoras associadas implicadas na regulação de vias metabólicas pode exceder o repertório de proteínas cinases (Chung et al., 2009).

As proteínas cinases também podem atuar na inibição do desenvolvimento de diferentes estágios do ciclo de vida de plasmódio (Le Roch et al., 2008; McRobert et al., 2008; Kato, 2016). Inibidores de proteínas cinases podem interferir no crescimento do parasita e, portanto, serem utilizados para o desenvolvimento de terapias farmacoterápicas para o combate da malária (Wu et al., 2009).

A exemplo do potencial do emprego de terapias farmacológicas, temos as proteínas implicadas na regulação cromossômica como as histonas, que apresentam amplo número de sítios de fosforilação (Bautista et al., 2014). Em histonas, as fosforilações são mais frequentes na região N-terminal e podem controlar diversos processos nucleares do parasita (Dastidar et al., 2013). Elas podem estar associadas de forma reversível a mitose, condensação cromossômica, replicação do DNA, ativação de transcrição, apoptose, resposta ao estresse e ao dano do DNA, a depender do contexto e sítio da fosforilação (Berger, 2010). Tratamentos

que afetem a atividade reguladora das mitocôndrias podem afetar criticamente a estratégia energética e sobrevivência do parasita.

Apesar de ser um tema de relevância, existe pouca informação produzida que permita a predição das respostas celulares aos tratamentos dirigidos a proteínas cinases e fosfatases (Solyakov et al., 2011).

Alguns estudos sobre o fosfoproteoma da malária têm sido conduzidos com o estágio sexuado de *Plasmodium berghei* (Bautista et al., 2014;Alonso-Morales et al., 2015) e principalmente com os diversos estágios do ciclo reprodutivo de *Plasmodium falciparum* (Lasonder et al., 2012;Pease et al., 2013;Lasonder et al., 2015), *Plasmodium vivax* (Panichakul et al., 2015), mas também de forma comparativa com outros organismos próximos, como *Toxoplasma gondii* (Treeck et al., 2011; Mitcheson et al., 2015), e com organismos distantes, como leveduras e seres humanos (Wu et al., 2009; Talevich et al., 2012).

O genoma do plasmódio abarca de 84 a 99 genes codificando proteínas cinases (Talevich et al., 2012). Isto representa de 1,1 a 1,6% dos genes codificados em *P. falciparum* (Solyakov et al., 2011) e reflete a importância que os eventos de fosforilação tem para as células (Chung et al., 2009).

Muitas das proteínas cinases ortólogas essenciais em *P. berghei* são também essenciais em *P. falciparum* (Lasonder et al., 2012). O cinoma é pouco redundante (Lasonder et al., 2012) e apresenta um número de 85 cinases (Solyakov et al., 2011;Guttery et al., 2014) em contrapartida com a estimativa de 67 fosfatases para *P. falciparum* (Pandey et al., 2014). Em *P. berghei*, a estimativa é de 60 cinases e 16 fosfatases, das quais 10 cinases e 10 fosfatases são específicas de gametócitos e sexo-específicas (Khan et al., 2005).

Assim como em eucariotos em geral, as principais fosforilações nos plasmódios acontecem também em resíduos de aminoácidos do tipo serina e treonina (Chung et al., 2009;Talevich et al., 2012) e, com menor frequência, em resíduos de histidina (Hanks, 2003;Pandey et al., 2014) e tirosina (Solyakov et al., 2011).

Dentre estas categorias, as tirosinas são alvo de interesse particular, apesar de ser uma das fosforilações menos frequentes, posto que parasitas do gênero *Plasmodium* não codificam tirosina cinase em seu genoma (Talevich et al., 2012;Lasonder et al., 2015) e estas fosforilações observadas seriam resultado da atuação de tirosinas cinases do hospedeiro

quando secretadas pelo parasita (Chung et al., 2009;Solyakov et al., 2011;Lasonder et al., 2012;Talevich et al., 2012;Lasonder et al., 2015).

Há evidências de que as fosforilações em tirosina são importantes para a viabilidade do parasita no estágio eritrocitário (Solyakov et al., 2011). Experimentos com aminoácido marcados teriam trazido à tona traços de fosfotirosina em sequências peptídicas no vacúolo parasitóforo do plasmódio. As fosforilações em resíduos de tirosina seriam produzidas não exclusivamente no eritrócito do hospedeiro, mas também pelo parasita e contabilizariam menos de 1% das fosforilações celulares (Solyakov et al., 2011).

Ainda não está totalmente esclarecido se a fosforilação de tirosinas ocorre apenas no vacúolo parasitóforo do parasita ou se são também fosforiladas quando alcançam o citoplasma do eritrócito do hospedeiro (Talevich et al., 2012). A ampliar a complexa conjuntura da atuação e regulação enzimática de cinase e fosfatase, há registro de proteínas cinases e fosfatases que são secretadas pelo parasita (Hiller et al., 2004) e que podem atuar dentro do hospedeiro nos mecanismos de fosforilação. Portanto, o quadro pode ser mais complexo onde a fosforegulação do parasita e do hospedeiro estejam mais estreitamente relacionada ou interdependente.

Proteínas fosforilases frequentemente procedem a um nível sub-estequiométrico e coordenado por, ao menos, 4 tipos de fosfatases: O-fosfatases, N-fosfatases, S-fosfatases e aciclofosfatases (Eyrich et al., 2011). As proteínas cinases podem ser divididas em alguns grupos como AGC, CMGC, CK1, TKL e CaMK (Talevich et al., 2012).

Proteínas fosfatases são classificadas em quatro grandes famílias (Chung et al., 2009;Pandey et al., 2014):

- 1) PPP – Fosfoproteínas fosfatases (*Phosphoprotein phosphatases*);
- 2) PPM – Metalofosfatases (*Metallophosphatases*);
- 3) PPT – Proteínas tirosina fosfatases (*Protein Tyrosine Phosphatases*);
- 4) NLF – Fatores de interação do tipo fosfatase (*Interacting Factor Like phosphatases*).

Porém, há também a descrição de outros dois grupos:

- 5) RHOD – Domínio de homologia Rhodanese (*Rhodanese Homology Domain*);

6) PTPLA – Proteínas do tipo Proteínas tirosina fosfatases (*Protein-Tyrosine Phosphatases-Like Proteins*).

Os estudos com plasmódio não apontam que existam proteínas glicosiladas contendo ácido siálico intracelular no repertório proteico do plasmódio e, conseqüentemente, há a dispensa do uso de enzimas glicolíticas como a PNGase-F (Larsen et al., 2007; Wu et al., 2009; Orsburn et al., 2011; Solyakov et al., 2011; Lasonder et al., 2012; Dastidar et al., 2013; Alonso-Morales et al., 2015; Lasonder et al., 2015; Panichakul et al., 2015) para um proteoma mais preciso após enriquecimento por técnicas de fracionamento/enriquecimento de proteínas e peptídeos, como o enriquecimento por microcolunas de dióxido de titânio (Larsen et al., 2007). Desta forma, o racional dos trabalhos de fosfoproteômica tem seguido um racional geral que contempla seis etapas principais: 1) extração das proteínas; 2) hidrólise enzimática; 3) fracionamento proteico; 4) enriquecimento de fosfopeptídeos; 5) espectrometria de massas; e 6) análise bioinformática (Orsburn et al., 2011; Lasonder et al., 2012; Mitcheson et al., 2015).

Ao longo das rápidas etapas do complexo ciclo de vida do gênero *Plasmodium*, investigações inquiram quanto aos mecanismos de regulação que sejam eficientes (Talevich et al., 2012) para atender a gama de transformações por que passa o parasita ao longo de cada estágio de vida.

O proteoma tem sido estudado em busca dos mecanismo de regulação e transformações celulares (Doerig et al., 2009). A fosfoproteômica se encarrega de sobrelevar os eventos de fosforilação e desfosforilação e as redes de sinalização celular em células e tecidos através de espectrômetros de massas de elevada sensibilidade (Olsen et al., 2006; Rosenqvist et al., 2011) e em larga escala.

O papel das fosforilações na regulação de processos essenciais do parasita a partir da descrição de proteínas fosforiladas pode ampliar o conhecimento sobre o fosfoproteoma global e as variações quantitativas após tratamento medicamentoso ou manipulação genética (Mitcheson et al., 2015).

Uma das vantagens das análises pós enriquecimento subproteômico é a redução da complexidade proteica da amostra e a possibilidade de aferir com maior robustez experimental as detecções.

2. Justificativa científica

A malária continua sem tratamento eficaz que elimine o seu fardo para a humanidade. A reprodução sexual é uma etapa essencial do ciclo reprodutivo e informações críticas sobre os mecanismos moleculares cruciais para a biologia dos organismos do gênero ainda não foram completamente elucidadas de maneira que permita a produção de drogas eficazes para prevenção, produção de vacinas ou ampliação de alternativas de tratamento. A gametogênese é um evento biológico determinante para a perpetuação do parasita em que procedem drásticas alterações morfológicas e de metabolismo, resultando, em um curto intervalo de tempo de 15 minutos, na produção de 8 gametas masculinos a partir de um gametócito masculino. A compreensão mais completa da biologia do parasita na gametogênese se faz necessária.

Work Justificative

Malaria still constitutes a major burden for humankind. The increasing emergence of resistance of the parasite *Plasmodium* to the available antimalarial drugs and the absence of efficient vaccines required an urgent need of development of new therapeutic strategies to fight against that disease. The sexual reproduction is an essential step of *Plasmodium* life-cycle and constitutes an attractive target for the development of new therapeutic approaches since blockage of this essential step would led to new strategies to control malaria based on an inhibition of the parasite transmission to *Anopheles*, and then to humans. Male and female gametes formation (gametogenesis) is thus a biological event that is determinant for the perpetuation of the parasite in which drastic morphological and metabolic changes occur in a short time interval, resulting in the production of 8 male gametes from a male gametocyte, and fertilization of the female gamete. Development of such transmission-blocking strategies required a deep understanding of the molecular and cellular events associated to gametogenesis. Despite several studies done on malaria, our understanding on gametogenesis is still incomplete and requires further investigations.

3. Objetivos gerais

Investigar os eventos moleculares associados à formação de gametas de *Plasmodium berghei* em linhagem selvagem NK65 (New York – Katanga, 1965) com a utilização de linhagem “wild type” e de linhagem mutante com interrupção do gene cinesina 8 (Δ kin8), incapaz de produzir gametas, a fim de identificar os mecanismos cruciais no transcurso da gametogênese de forma a guiar o desenvolvimento de vacinas e agentes imunoterápicos.

A análise visa contribuição descritiva do proteoma e fosfoproteoma da gametogênese de *P. berghei* tomando-se três momentos específicos da diferenciação: gametócitos quiescentes (T0), 7 minutos após indução da gametogênese pelo uso do ácido xanturênico (T7) e com 15 minutos (T15).

Também objetivada por este estudo é uma análise quantitativa e comparativa das proteínas do proteoma e do fosfoproteoma durante o desenvolvimento do selvagem, do mutante e entre as duas linhagens em cada um dos tempos específicos da diferenciação escolhidos neste estudo.

General objectives

- To investigate the molecular events associated to the formation of *Plasmodium berghei* gametes in lineage NK65 (New York - Katanga, 1965) using wild type and mutant lines with disruption for kinesin 8 gene (Δ kin8), unable to produce gametes, in order to identify the crucial mechanisms involved during gametogenesis.

- To provide new insights on molecular processes involved in gametogenesis, we undertook here the first quantitative and comparative proteomic and phosphoproteomic time-course analysis of the xanthurenic acid-induced gamete development in *P. berghei* wild type and kinesin 8-deleted mutants. Protein and phosphoprotein relative quantitative comparisons over 7 and 15 min of gametogenesis induction were performed through iTRAQ labelled peptides.

4. Materiais e métodos

4.1. Produção de gametócitos

A etapa de manipulação animal foi realizada no Museum National d'Histoire Naturelle, aprovado e seguindo as normas do comitê de ética Comité Cuvier d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale (COMETH).

A linhagem de *P. berghei* utilizado foi a NK65 (New York, Katanga). Os parasitos estudados são os selvagens e os parasitos mutante para o gene da cinesina 8.

O ciclo eritrocitário dos parasitos foram mantido em camundongos fêmeas não consanguíneas, Swiss OF1, com 4 a 6 semanas de idade. A infecção é por via intraperitoneal a partir de uma ampola de 1/3 de sangue parasitado e 2/3 de solução de congelação (9 volumes de solução de Alsever [NaCl 4,2 g/L, ácido cítrico 0,55 g/L, citrato de sódio 8 g/L et D-glicose 20,5 g/L, 1 volume de glicerol] criopreservado em nitrogênio líquido. A parasitemia dos camundongos foi verificada por esfregaço sanguíneo corado May-Grünwald Giemsa e observada ao microscópio óptico.

O início do tratamento dos camundongos foi com injeção intraperitoneal de 100 µL de fenilidrazina 25 mg/mL (Acros Organics, cat# 151551000); 0,9% NaCl a fim de provocar condição anêmica nos camundongos e assim estimular a hiper-reticulogênese (Flanagan J. P., 1970) e, conseqüentemente, a presença de reticulócitos circulantes no sistema sanguíneo dos animais. No 2º dia, os roedores foram infectados intraperitonealmente com 1×10^7 de parasitos de camundongo doador infectado, com parasitas em sua 4ª passagem e deixados em repouso para desenvolvimento da infecção até o quinto dia. No 5º dia, os animais foram tratados oralmente com solução a 15 mg/mL sulfadiazina (Silgma-Aldrich, Cat# S8626) na água de beber. Sulfadiazina é um antibiótico que mata especificamente, estágios jovens eritrocitários de *Plasmodium*. Dia 7, os camundongos foram sacrificados, sangue coletado com heparina e gametócitos foram obtidos por centrifugação em gradiente de densidade (Beetsma et al., 1998; Sinden et al., 2002). Parasitemia e gametocitemia foram monitorados diariamente durante o tratamento com esfregaço de sangue.

4.2. Separação das células

O enriquecimento de gametócitos a partir do sangue dos murinos coletados com heparina foi obtido por gradiente de densidade e 48% Nycodenz em meio *Coelenterazine Loading Buffer* (CLB) (PBS, 20 mM HEPES, 20 mM Glicose, 4 mM bicarbonato de sódio, 1 mM EDTA, e pH 7,25). O protocolo de enriquecimento foi baseado em Baetsman et al. (Beetsma et al., 1998; Sinden et al., 2002) com algumas modificações.

O sangue coletado foi misturado com meio CLB a temperatura ambiente para remoção do soro e de proteínas dispersas nele. A proporção foi de 5 ml de meio CLB para o sangue de cada dois camundongos, aproximadamente 2 ml. O sangue misturado com meio CLB foi centrifugado por 5 min a 600 x g. O sobrenadante foi removido e 2 ml de meio CLB adicionado a amostra e suavemente homogeneizado por pipetagem. A amostra foi em seguida depositada na superfície de 5 ml de solução de Nycodenz a 48% e 52% meio CLB a temperatura ambiente e centrifugado por 10 min a 1000 x g. Os gametócitos depositados no gradiente foram coletados com uma pipeta de 1 ml e transferidos para um novo tubo. A amostra foi lavada com cerca de 500 µL de meio CLB a temperatura ambiente, proporção aproximada de 1:1 volume de gametócitos e meio CLB, para remoção da solução de Nycodenz. A amostra foi novamente centrifugada, a 800 x g. O sobrenadante foi descartado e os gametócitos resuspendidos em meio CLB a temperatura ambiente de forma a obter volume variável de 30 a 70 µL, a depender da quantidade de gametócitos obtidos.

4.3. Obtenção das triplicatas biológicas

A exflagelação foi obtida *in vitro* a partir do enriquecimento de gametócito pela adição de ácido xanturénico (XA), o indutor natural da gametogênese no mosquito (Billker et al., 1998) combinado com diminuição da temperatura. A contagem dos parasitos com exflagelação é feita com câmara de Malassez.

A solução de ativação da gametogênese, composta de meio CLB suplementado por 200 µM de XA a fim de atingir concentração final de 100 µM XA quando homogeneizada com os gametócitos foi condicionada em gelo após sua preparação imediatamente antes do uso.

Após o enriquecimento celular, uma alíquota de gametócitos, células não estimuladas, foi separado em novo tubo e congelada em nitrogênio líquido. Outros dois terços das células foram estimulados para diferenciação pela variação da temperatura e presença de XA, com a solução de ativação, de acordo com (Beetsma et al., 1998). Uma alíquota de células estimuladas foi congelada em nitrogênio líquido após 7 minutos do estímulo a diferenciação. Uma última alíquota foi congelada após 15 minutos do estímulo.

O processo de diferenciação foi observado por microscopia ótica, em câmara de Malassez, a partir de uma pequena alíquota das células estimuladas.

Portanto, temos que:

Tempo zero (T0): Alíquota de replicata biológica não estimulada para diferenciação;

Tempo sete (T7): Alíquota de replicata biológica estimulada para diferenciação e congelada após 7 minutos de estímulo;

Tempo quinze (T15): Alíquota de replicata biológica estimulada para diferenciação e congelada após 15 minutos de estímulo.

Foram realizados ao total 5 experimentos de enriquecimento do selvagem e 7 experimentos de enriquecimento do mutante. Destes, foram utilizados para experimentos subsequentes apenas 3 replicatas biológicas da condição selvagem como também da condição mutante para cinesina 8.

4.4.Lise celular e extração de proteínas

As células foram lisadas pela combinação de duas técnicas de lise: técnica de cisalhamento mecânico por congelamento e descongelamento; técnica química por agente caotrópico, pela incubação com uréia.

O extrato celular foi obtido a partir de três ciclos de congelamento/descongelamento das células na presença de solução de lise, composta na concentração final de lise por 8M de uréia e 2X do inibidor Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X (Thermo Scientific cat.# 78441).

Os ciclos de congelamento e descongelamento foram realizados pela imersão de cada tudo de amostra em nitrogênio líquido por 1 minuto e descongelado por imersão em água próxima de zero grau Celsius, com alguns intervalos para agitação das amostras por vortex para descongelamento homogêneo, até descongelamento total da amostra.

Para prevenção da hidrólise enzimática das proteínas e da atuação de fosforilases, além da atuação caotrópica da uréia, atuou na amostra o coquetel de inibidores de proteases/fosfatases para aminopeptidases, cisteíno e serino proteases, além de fosfatases de resíduos de aminoácidos de fosfoserina/fosfotreonina e fosfotirosina.

O lisado total de células foi congelado em nitrogênio líquido, transferido para freezer a -80 °C e liofilizado.

4.5.Precipitação de proteínas

O lisado total de células liofilizado foi transportado da França para o Brasil, onde foi resuspendido por 100mM TEAB (Fluka, Cat# 17902) para mesmo volume e concentração prévia a liofilização e, em seguida, precipitado por acetona/etanol para remoção de sais e contaminantes incompatíveis com procedimentos de quantificação e espectrometria de massas subsequentes como também para concentração da amostra.

A precipitação por etanol/acetona foi realizada conforme (Thingholm, 2008). Foram adicionados em tubos de propileno 4 volumes de etanol (J.T.Baker, Cat# B5924-03) 99,5% resfriado a -20 °C para cada volume de amostra e rapidamente homogeneizado. Após 5 minutos, 4 volumes de acetona (Silgma-Aldrich, Cat# 32201-L) 99,5% resfriado a -20 °C foi homogeneizado para cada volume inicial da amostra e deixada para precipitação por toda a noite a -20 °C. Em continuação, as proteínas foram centrifugadas por 15 minutos a 4 °C e 13.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado por solução de etanol+acetona+água (4:4:2) resfriada por três vezes.

Ao final do procedimento de precipitação, as proteínas foram resolubilizadas em solução com 8M de uréia (GE-Healthcare, Cat# 17-131901) em 100mM TEAB e centrifugada por 15 minutos a 4 °C e 13.000 x g. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo para digestão enzimática.

4.6. Hidrólise enzimática de proteínas

A hidrólise enzimática das proteínas dos extratos celulares foi efetuada com a combinação da ação de duas enzimas de elevada especificidade: Tripsina, para sítios de clivagem C terminal de KR não sucedido de P; e Endoproteinase Lys-C, para clivagem C terminal de K não sucedido de P.

A combinação das enzimas permite a digestão de proteínas resistente a proteólise (Saveliev et al., 2013). Em condições desnaturantes por uréia resulta no aumento da eficiência da hidrólise enzimática e maior cobertura de identificações.

Previamente a ação das enzimas hidrolíticas, as proteínas foram reduzidas e alquiladas. A reação para redução das pontes dissulfeto das proteínas ocorreu em condição altamente desnaturante, na presença de 8M de uréia, e teve duração de uma hora a temperatura ambiente em solução a concentração de 20mM de DTT (Sigma-Aldrich, cat# 17-1318-02).

Em sequencia da redução por DTT, as proteínas foram alquiladas por reação em solução a concentração final de 40mM de *Iodoacetamide* (Sigma-Aldrich, cat# i1149, lote 29H5004) por uma hora a temperatura ambiente.

As proteínas foram digeridas inicialmente por *Endoproteinase Lys-C from Lysobacter enzymogenes* (Sigma-Aldrich, cat# p2289, lote SLBJ1672V) a 8M uréia por 12 horas e 25°C. Foi utilizada a proporção de enzima de 0,01 AU para cada 100µg de extrato proteico. Em seguida, o tubo de reação enzimática foi diluído por solução de 100mM TEAB e 10% ACN (Mallinckrodt Baker, cat# 0043) até a concentração de uréia de 1M, quando a ação enzimática da Lys-C ocorreu por outras 4 horas a 25°C concomitantemente a ação de hidrólise enzimática da tripsina suplementada ao tubo.

Para a digestão por tripsina foi utilizado o produto *Sequencing Grade Modified Trypsin* (Promega, cat#V5111, lote 0000106205) após a diluição da solução com os extratos proteicos até a concentração final de 1M de uréia. Foi utilizada a proporção de 1µg de tripsina para cada 100µg de extrato proteico.

Ao final de 4 horas da ultima etapa de hidrólise enzimática do extrato proteico por Lys-C e tripsina, as amostras foram acidificadas por TFA, ácido trifluoracético (Sigma-

Aldrich, cat# T6508), à concentração final de 0,1% ácido trifluoracético e desalinizadas/concentrada para quantificação de peptídeos e marcação por iTRAQ.

4.7.Dessalinização de amostra

Após a digestão enzimática as amostras foram desalinizadas, liofilizadas para eliminação de ACN, resuspendida em TEAB e quantificadas. Após a quantificação, a amostra foi resuspendida em 300mM TEAB para marcação por iTRAQ, fosfoenriquecimento, e análise por espectrometria de massas.

A dessalinização das amostras foram feitas por meio de microcolunas manufaturadas por um tampão de 3m C8 Empore Disk em uma extremidade seguida de 5,6 mg de resina de fase reversa POROS 20 R2 (Applied Biosystems, cat# 1-1129-06) e 5,6 mg de resina Oligo R3 (Applied Biosystems, cat# 1-1339-06) na outra extremidade da microcoluna. A capacidade de cada coluna foi projetada para concentração e dessalinização de aproximadamente 400 µg de proteínas, tendo em vista que a capacidade das resinas é de ao menos 35,7ng de proteína por grama de resina. O tampão de C8 foi engendrado para captura de peptídeos mais hidrofílicos, de menor retenção pelas resinas POROS utilizadas.

Na montagem das colunas, uma solução estoque com cada matriz de resina foi preparada a partir de sua suspensão em solução de 50% de acetonitrila a concentração final de 14µg/µL de resina. Para cada coluna, foram utilizadas 400 µL de cada solução estoque bem homogeneizada, correspondente a 5,6 mg de resina.

As colunas montadas foram lavadas por 100% ACN e em seguida equilibradas por 2 volumes da coluna (aproximadamente 300 µL) de solução de TFA 0,1%. Em seguida, o sobrenadante da amostra previamente centrifugada a 15.000 x g por 5 min e separados em um novos tubos, foram acidificados para pH entre 2-3 e percolados através das microcolunas com o uso de seringa. Posteriormente, a coluna foi lavada por cerca de 5 volumes de coluna de solução de TFA 0,1%, 1000 µL, e a amostra eluída por 3 lavagens de 200 µL de solução a 70% ACN e 0,1% TFA.

O eluído foi concentrado por speed-vac e em seguida resuspendido em TEAB 300mM a concentração esperada para 8µg/µL, tendo por base a contagem do número de

células da preparação da amostra e estimativa da quantidade de proteínas para quantificação por Qubit.

4.8. Quantificação de peptídeos

Os peptídeos digeridos e dessalinizados foram quantificados no Qubit 2.0 Fluorometers (Invitrogen , cat# Q32866), firmware v3.1, de acordo com instrução do manual do fabricante após resolubilização em 300mM TEAB.

Brevemente, os reagentes foram preparados no momento de uso e sob proteção contra luminosidade após atingirem temperatura ambiente. A incubação da amostra e dos padrões de referencia foram incubados em tubos também a temperatura controlada.

A incubação das amostras foram feitas em duplicatas e dentro do intervalo de 10 minutos da incubação dos padrões de referencia em triplicata. Faixa de leitura de absorvância por fluorescência utilizada foi de 0,001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - 0,00125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, correspondente de 0,2 μg a 0,25 μg de peptídeos. As amostras e padrões foram incubados por 15 minutos até a leitura na leitura de absorvância.

4.9. Marcação de peptídeos por iTRAQ

Amostra quantificada por Qubit tiveram seu volume ajustado por 300mM TEAB a fim de alcançar a concentração de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de peptídeos. Desta forma, cada 25 μL de amostra submetida a reação de marcação por iTRAQ continha 100 μg de peptídeos.

Cada amostra utilizou um marcador do 4-plex iTRAQ Reagent Multi-plex Kit (Applied Biosystems, cat# 4352135) de acordo com procedimento recomendado pelo manual do fabricante para marcação da cadeia lateral em resíduos de aminoácidos de lisina dos digestos proteicos e grupos N-terminais.

Em resumo, foi produzida uma reação com cada 2 5µL de amostra contendo 100 µg de proteínas com 70 µL da solução correspondente do isótopo marcador e incubado a temperatura ambiente por 2 horas, com passos de homogeneização a cada 30 minuto.

Ao final da marcação isotópica, previamente a montagem definitiva dos multiplex, as proporções de marcadores foram testados via espectrometria de massas. Um micro-ensaio de multiplex foi construído a partir da combinação de volumes de 1 µL de cada amostra marcada, dessalinizada pelo protocolo StageTip, que segue a seguir, e submetida a espectrometria de massas.

As configurações teste dos multiplex tiveram o mesmo desenho experimental dos multiplex definitivos, reportados a seguir (Figura 28). Alíquota das amostras na proporção de 1:1 e 1:1:1, totalizando respectivamente 2µg, 3µg e 4µg de proteínas foi utilizada para formação dos micro-multiplex teste de número 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 e 12.

A proporção dos isótopos marcadores foi verificada de antemão a montagem definitiva dos multiplex com base na razão da intensidade de cada ion assinatura detectado em toda a análise de espectrometria de massas em Orbitrap. O protocolo da análise espectrometria é diferencia-se da análise dos multiplex descrita a subseqüentemente a este tópico apenas no tempo de análise, 110 minutos.

A análise dos ions assinatura dos micro-ensaios de multiplex foi realizada pela conversão de arquivos .raw em .mgf na faixa e leitura de valores de intensidade dos ions pelo script programado em R desenvolvido *in home* por Alan Ribeiro Mól e Prof. Wagner Fontes.

4.10. Preparação de amostras multiplexadas

Para análise em curso de tempo, amostras com diferentes marcações por iTRAQ foram combinadas para redução de variabilidades técnicas e para quantificação relativa das proteínas expressas antes e durante a gametogênese. A combinação de amostras foi projetada de forma a permitir análise em separado da linhagem selvagens em suas replicatas biológicas e experimentais (Figura 26), da linhagem mutante e, finalmente da combinação entre selvagem e mutante.

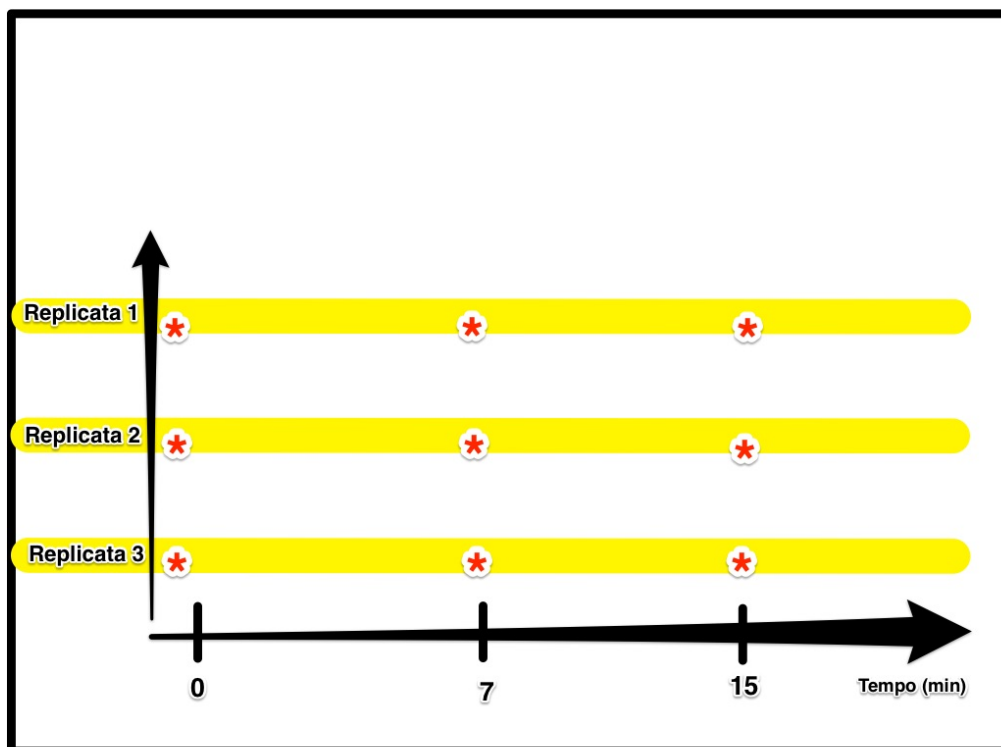


Figura 26 : Desenho experimental da análise intra-classe dos experimentos dos selvagens como também para experimento com os mutantes.

Todas as amostras, com diferentes marcadores, foram combinadas em proporções próximas de 1:1. Amostras da linhagem selvagem receberam pela reação química do iTRAQ rótulos de marcação 114, 115 e 116. Amostras da linhagem mutante receberam rótulos 115, 116 e 117. Foram produzidos 3 replicatas biológicas para cada tipo de marcação com uma quantidade total de cerca de 300 μ g de peptídeo em cada amostra. Amostras das quais a combinação de rótulos foi planejado para comparação de selvagem e mutante receberam rótulos 114, 115, 116 e 117, e alcançaram a quantidade final de aproximadamente 400 μ g de peptídeo por amostra.

Cerca de 20 μ g de peptídeos de cada combinação de amostra foram empregados para análise do proteoma total. O restante dos peptídeos foram utilizados no enriquecimento de fosfopeptídeos em colunas de dióxido de titânio. Portanto, em resumo, tivemos as combinações de rótulos a seguir.

Combinação de amostra de linhagem selvagem, totalizando 3 amostras biológicas com 300 μ g de peptídeos cada:

Rótulo 114 => Amostra Selvagem T0 (100 µg);

Rótulo 115 => Amostra Selvagem T7 (100 µg);

Rótulo 116 => Amostra Selvagem T15 (100 µg);

Combinação de amostra de linhagem mutante, totalizando 3 amostras biológicas com 300 µg de peptídeos cada:

Rótulo 117 => Mutante K8 T0 (100 µg);

Rótulo 114 => Mutante K8 T7 (100 µg);

Rótulo 115 => Mutante K8 T15 (100 µg);

Combinação de amostra selvagem e mutante, totalizando 3 amostras biológicas com 400 µg de peptídeos cada:

Amostras selvagem T0 (100 µg) => Rótulo 114

Amostras selvagem T15 (100 µg) => Rótulo 116

Amostras mutantes T0 (100 µg) => Rótulo 117

Amostras mutantes T15 (100 µg) => Rótulo 115

Combinação de amostra selvagem e mutante, totalizando 3 amostras biológicas com 200 µg de peptídeos cada:

Amostras selvagem T7 (100 µg) => Rótulo 116

Amostras mutantes T7 (100 µg) => Rótulo 117

4.11. Enriquecimento de fosfopeptídeos por TiO₂

Para o enriquecimento de fosfopeptídeos, aproximadamente 280 a 380 µg de peptídeos de cada multiplex foi utilizado resina de cromatografia de afinidade por TiO₂, como descrito previamente (Thingholm et al., 2006; Jensen and Larsen, 2007), com modificações. A resina de TiO₂ foi resuspendida em 100% ACN e utilizados para incubação da amostra na proporção de 0,6mg de resina para cada 100µg de peptídeo. Previamente a incubação, a amostra foi equilibrada com *loading solution* na proporção de 1:5 (V:V, amostra: *loading solution*). A resina equilibradas por *loading solution* (1M ácido glicólico em 80% ACN em 5% TFA); Foram realizadas três etapas de incubação da amostra com a resina de TiO₂, por cerca de 10-15 minutos seguidos de lavagem da resina com a amostra por 80% ACN em 1% TFA, uma segunda lavagem da resina 80% ACN em 0,1% TFA e, finalmente, uma primeira eluição da amostra por solução de 0,28% de amônia, pH 11. Ao final, uma segunda eluição por 30% ACN.

Amostras eluídas foram dessecadas por speed-vac. Em e desalinizadas por StageTip para espectrometria de massas, de acordo com o procedimento descrito a seguir.

4.12. Dessalinização de peptídeos por STAGETIP para espectrometria de massas

Para concentração e dessalinização de peptídeos marcados por iTRAQ antes da espectrometria de massas, foi utilizado protocolo modificado de Ishihama para micro-coluna do tipo StageTip (Rappsilber et al., 2007). A coluna foi montada a partir de um plug de C8 e 6 discos de C18 em ponteira de p200 feitos a partir de agulha de HPLC de calibre 20. A coluna montada foi lavada por metanol e 100% ACN. Em seguida, foi equilibrada por solução de equilíbrio (TFA 1%). A amostra diluída em 5 vezes na solução de equilíbrio foi injetada na micro-coluna e em seguida, lavada por solução de 0,5% ácido acético. Para cada amostras, foram realizadas eluições em novo tubo por um gradiente formado por 3 soluções de ACN em 0,5% ácido acético. Foi utilizado cerca de 30 µL para cada solução. A primeira de 25% ACN, a segunda de 50% ACN e a terceira de 80% ACN. Uma quarta eluição foi realizada por 100% ACN. Após procedimento por StageTip, amostras foram secadas em speedvac e, imediatamente antes da espectrometria de massas, foram resuspendidas em 5 µL de ácido fórmico a 0,1%.

4.13. Espectrometria de massas

Amostras multiplexadas enriquecidas e não enriquecidas foram aplicadas para análise em triplicatas biológicas e uma replicata técnica de cada.

Os dados foram adquiridos por sistema de LC-MS/MS com colunas capilares em Dionex Ultimante™ 3000 RSLCnano system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) diretamente acoplada à espectrômetro de massas híbrido do tipo iontrap-orbitrap, Orbitrap Elite™ ETD (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA).

As amostras foram carregadas primeiramente em pré-coluna de tubo capilar de sílica fundida de dimensões 200 µm x 100 µm, manualmente empacotadas com partículas esféricas de sílica revestida por resina Reprosil-Pur 120 Å C18-AQ 5 µm (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany, cat. n# r13.aq.) e então fracionada por coluna analítica fase reversa de 35 centímetros e 75µm de diâmetro, montada manualmente a partir de tubo capilar de sílica fundida preenchido por resina Reprosil-Pur 120 Å C18-AQ 3 µm (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany, cat. n# r15.aq.).

Os peptídeos solubilizados em 0,1% de ácido fórmico em água foram injetados na pré-coluna pela técnica de *microliter pick-up injection* e lavados a fluxo de 3 µL/min com a solução de 98% do solvente A (0,1% de ácido fórmico em água) e 2% solvente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila).

A cromatografia foi realizada por 210 minutos a fluxo de 230 nL/min divididos em etapas de gradiente de 2-40% do solvente B por 170 minutos; 40-85% até 185 min; 85% por 10 min, até 190 min; e finalmente, 2% até 210 min.

A amostra fracionada foi ionizada a 2,5 kV pela fonte de ionização Nanospray Flex™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e temperatura de capilar a 275 °C.

4.14. Processamento de dados

Dados foram adquiridos por espectrometria de massas em modo positivo por *Data-Dependent Acquisition*, operado pelo software Xcalibur 2.2 SP 1.78 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

Escâner de varreduras foram ajustadas para utilizar resolução de 120.000 FWHM, m/z de 400, valor alvo de controle de ganho automático de 1×10^6 íons para todas leituras no FTMS e tempo máximo de preenchimento de 200 ms, faixa de m/z de 300 a 1800 e seleção dos 15 picos mais intensos com carga diferente de +1 a cada ciclo de trabalho para fragmentação por MS² com uso de elevada energia de colisão, por *higher-energy collisional dissociation*, e energia de colisão normalizada de 50% para uma replicata técnica e 35% para a segunda replicata técnica, e valor alvo de íons igual a 1×10^4 no íon trap linear.

Os eventos de leitura para isolamento do pico monoisotópico tiveram janela de 2 Th e carga padrão de 2. Não foi habilitada a função de massas fixas. Tempo de ativação de 0,1ms. Filtragem de estado de carga foi habilitado com as configurações de repetição de contagem = 1; duração da repetição = 90 s; exclusão de tamanho da lista de exclusão = 500. Parâmetro de ativação q = 0,25.

4.15. Identificação de proteínas

O programa PatternLab for Proteomics v.4.0.27 (Carvalho et al., 2016) foi utilizado para identificação e análise quantitativa das proteínas. As buscas para identificações utilizou a comparação dos dados experimentais da espectrometria de massas com espectros teóricos produzidos a partir de sequencias proteínas anotadas em bancos de dados. A comparação dos dados teóricos contra os experimentais foi realizada através da ferramenta Comet MS/MS search engine v.2015.020 implementada no software.

O banco de dado com *target-decoys* utilizado na busca por PSM foi elaborado a partir da combinação de dados de *Plasmodium berghei* ANKA com *Mus músculos*. Sequencias de proteínas armazenadas em GeneDB, banco de dados, release 26 do PlasmoDB, para *Plasmodium berghei* ANKA (5.143 sequencias). Para *Mus músculos* (50.814

sequencias), as sequencias proteicas foram obtidos em formato fasta depositada em The National Center for Biotechnology Information, NCBIInr. O banco de dados utilizado totalizou 55.957 sequencias, incluindo padrão de 127 sequencias de contaminantes frequentes oferecida pelo Patternlab. Decoys foram obtidos a partir de sequencias reversas do banco de dados construido.

Os arquivos de dados no formato .raw foram submetidos a busca para identificação de proteínas utilizando como parâmetros especificidade enzimática na hidrólise proteica como semi-trípica, com tolerância para até 2 clivagens perdidas, modificação fixa de resíduos de cisteínas carbamidometilados, iTRAQ-4plex variável em resíduos de tirosina, e fixa e N-terminal para resíduos de lisina, modificação variável para fosforilação de resíduos de Serina, Tirosina e Treonina em amostras enriquecidas por dióxido de titânio, Fragment bin tolerance = 1,0005, Fragment bin offset = 0,40, Theoretical frag ions = M peak only, busca na faixa de massa entre 550 e 5500.

Resultados da busca foram pós-processado e filtrados estatisticamente via Search Engine Processor (SEPro). O resultado de *Peptide Sequence Matches* obtidos a partir do processamento estatístico em SEPro levou em conta somente peptídeos com False Discovery Rate (FDR) de 0,15% e proteínas com FDR 0,57%. Os valores de FDR foram calculados automaticamente pelo programa ao se definir como aceitável somente FDR < 2% para peptídeo e FDR <1% para proteínas. Para cada grupo de proteínas, foi usado valores de *Primary Score*, *Secondary Score* e *DeltaCN* para gerar automaticamente uma função de discriminador Bayesiano.

Na análise diferencial das proteínas no proteoma total, atendiam aos critérios aquelas proteínas que tinham sua identidade confirmada por ao menos dois peptídeos que haviam passado pelos filtros estatísticos. Para o fosfoproteoma, um único peptídeo por proteína foi tolerado. O modulo utilizou o teste stouffer, p-valor e q-valor de Benjamin-Hochberg na análise das proteínas de abundancia diferencial.

4.16. Ontologia de genes

A categorização funcional das proteínas foi avaliada através do programa Blast2GO, versão 3.3.0, build 201605091812. A sequência de cada proteína identificada por PSM utilizada no programa Blast2GO foi obtida no formato .fasta pelo programa PatternLab. O alinhamento de sequências através do alinhamento BlastP, versão 2.2.31+, usou os parâmetros default do programa com exceção do Word Size = 3 e do número de hits, que foram aumentados de 20 para 30 hits. Blast Expectation Value, também default, foi de 0,001 e filtro “F”. Os alinhamentos utilizaram todos organismos no banco de dados NCBI nr e o serviço público de alinhamento CloudBlast (BioBam Bioinformatics S.L. Valencia, Spain).

5. Resultados

A apresentação dos resultados foi dividido em duas sessões na qual podemos observar na Parte I a análise centrada no desenvolvimento do gameta selvagem ao longo do tempo e na Parte II a análise centrada no mutante durante 15 minutos de desenvolvimento e comparado com o desenvolvimento do selvagem.

5.1. Parte I - Dynamic molecular events associated to *Plasmodium berghei* gametogenesis through proteomic and phosphoproteomic approaches

Carlos H. S. Garcia^{1,2} Delphine Depoix², Rayner M. L. Queiroz¹, Jaques M.F. Souza¹, Wagner Fontes¹, Marcelo V. de Sousa¹, Marlon D. M. Santos³, Paulo C. Carvalho³, Philippe Grellier^{2*} and Sébastien Charneau^{1,*}

1 Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasilia, Brasilia, 70910–900 Brazil.

2 UMR 7245 CNRS Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Universités, CP52, 61 rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France

3 Computational Mass Spectrometry Group, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Parana, Brazil.

CORRESPONDING AUTHORS:

e-mails: charneau@unb.br (Sébastien Charneau, PhD), grellier@mnhn.fr (Philippe Grellier, PhD)

KEYWORDS:

Plasmodium, gametogenesis, exflagellation, quantitative proteomics, phosphopeptide, proteome, phosphoproteome

This manuscript section is shown as paper format in English, at its final development step, and as part of the first thesis' publication.

Abstract

Plasmodium mature sexual cycle occurs in the vector mosquitoes and ensures the transmission to a new host. Gametogenesis is a rapid process that takes place within minutes in the vector midgut. Gametocytes have to complete a deep nuclear reorganization, quick differentiation, and in the case of male gametocytes, intracytoplasmic flagellum assembly that results in the formation of eight flagellar and free-swimming microgametes required for macrogamete fertilization. In efforts to improve our knowledge of molecular mechanisms involved in gamete morphogenesis, we carried out a quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis throughout the xanthurenic acid-induced gametogenesis of rodent *P. berghei*. Time-course analysis were performed 7 and 15 min after gametogenesis induction. The high-resolution nano-LC/MS-MS analysis resulted in the identification of 443 proteins and 206 phosphoproteins from 2,617 iTRAQ-labelled peptides. Fifty-two proteins were found differentially expressed and 39 phosphoproteins showed modulation of their phosphorylation status within the 15 min of gamete formations. Proteins related to RNA translation, DNA, and protein biosynthesis were most prominent and strongly regulated throughout the gamete maturation, and phosphorylated proteins are mainly RNA, ATP or protein binding proteins. The energetic metabolic pathway, glycolysis, environmental stress response, RNA/protein biosynthesis and mitosis and axoneme formation, both related to tubulin-associated cytoskeleton dynamic, were predominant regulated cell processes at protein and phosphoprotein level during the differentiation. This is the first high-throughput proteomic and phosphoproteomic time course analysis of *Plasmodium* gamete development and sheds light on the biological protein orchestration within gametogenesis.

1. INTRODUCTION

Despite the decline of malaria deaths by 48% in the last 15 years among populations at risk (438,000 in 2015), malaria remains a major cause of death for children, particularly in sub-Saharan Africa, taking the life of a child every 2 min. Moreover, there are no licensed vaccines against malaria and in recent years, parasite resistance to the best available treatment, artemisinin-based combination therapy (known as ACT), has emerged (WHO, 2015c).

Malaria is due to the development in vertebrates of a protozoan parasite belonging to the *Plasmodium* genus. Uptake of sexual precursor cells, the male and female gametocytes, from vertebrate blood during the *Anopheles* vector meal leads to the mosquito infection and to the genesis of sporozoites that accumulate into the salivary glands. Vertebrate infection occurs by injection of sporozoites from salivary glands to vertebrates during mosquito bite. Establishment of mosquito infection requires a differentiation of the haploid gametocytes into male and female gametes, a process called gametogenesis, for fertilization and formation of a diploid zygote in the gut lumen. The zygote differentiates into a mobile ookinete that crosses the midgut epithelium and settles to differentiate, after meiosis, into oocyst. The later, after multiple mitosis, produces sporozoites that migrate to the salivary glands.

Gametocyte maturation is blocked in G0 phase in vertebrate blood. Gametogenesis induction requires several changes of the parasite environmental conditions that are met in mosquito gut *viz.*: drop of temperature from 37 °C to around 20 °C, increase of pH from 7.4 to 7.8-8.0, O₂ change, and the presence of the inducer xanthurenic acid, a mosquito intermediate metabolite of tryptophan metabolism (Billker et al., 1998). Gametogenesis of *Plasmodium berghei*, a rodent parasite, is a quick process occurring within 15 to 20 min and involving 1) xanturenic acid-triggered calcium signalling to activate Ca²⁺-dependent protein kinases; 2) egress of the parasite from the red blood cells (RBC) by lysis of the parasitophorous vacuole and the erythrocyte membranes; 3) in male gametocyte, completion of three rounds of rapid mitotic DNA replication associated to the intracytoplasmic axoneme assembly that will produce 8 highly motile male gametes by a process called exflagellation (Florens et al., 2002a; Sinden, 2015b).

Reversible protein phosphorylation with protein kinases and protein phosphatases, rapid mitosis, and translational repression are major cell processes that have been highlighted

to orchestrate the *Plasmodium* sexual development (reviewed in (Guttery et al., 2015; Sinden, 2015a) as examples). Although several proteomic studies of *Plasmodium* gametocytes and gametes have been described (Florens et al., 2002b; Hall et al., 2005; Khan et al., 2005; Wass et al., 2012; Talman et al., 2014; Tao et al., 2014b), molecular and cellular events associated to gametogenesis are still incompletely characterized. To provide new insights on molecular processes involved in gametogenesis, we here disclose the first quantitative proteomic and phosphoproteomic time-course analysis of the xanthurenic acid-induced gamete development in *P. berghei*. Front to the quick transformation, the necessity to obtain high quantity of proteins and phosphoproteins from a reproducible triplicate and to minimize extensive manipulation period, we performed protein and phosphoprotein relative quantitative comparisons over 7 and 15 min of gametogenesis induction through iTRAQ labelled peptides.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *In vivo P. berghei* gametocytes production and *in vitro* gamete exflagellation process.

A pyrimethamine-sensitive clone of *Plasmodium berghei* NK65 strain (kindly provided by R. Ménard) was used throughout the study. *P. berghei* was maintained by cyclic passage in 4-6 weeks old female Swiss OF1 (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Enrichment and purification of gametocytes were achieved using a modified protocol from Beetsma *et al.* (Beetsma et al., 1998), as described in Guttery *et al.* (Guttery et al., 2012a). Briefly, mice were treated intraperitoneally (ip) with 100 μ L of 25 mg/ml phenylhydrazine in saline solution to induce hyper-reticulocytosis (Flanagan J. P., 1970). Two to three days later, mice were infected ip with 10^7 infected RBC from a donor mouse. At day 3 post-infection, mice were treated with sulfadiazine (Sigma) at 15 mg/L in drinking water for two days to kill asexual blood stages. On day five after infection, parasites were mainly constituted of gametocyte stages. Mice were euthanized; blood harvested with heparin and kept on ice. Gametocytes-infected RBC were separated from uninfected erythrocytes by a 48% NycoDenz gradient (27.6% w/v Nycodenz in 5 mM Tris-HCl, pH 7.2, 3 mM KCl, 0.3 mM EDTA) in coelenterazine loading buffer (CLB: containing PBS, 20 mM HEPES, 20 mM Glucose, 4 mM sodium bicarbonate, 1 mM EDTA, 0.1% w/v bovine serum albumin, pH 7.25) during 10 min at 1000 x g. Gametocyte-infected RBC were collected at the interphase, transferred into CLB-

containing tubes, centrifuged for 1 min at 800xg and the pellet resuspended in CLB, and Giemsa-stained smears realized. One third of the sample was immediately frozen in nitrogen liquid (Time 0) and xanthurenic acid (100 μ M final concentration) was immediately added to the remaining two thirds to induce gametogenesis. A small amount of cell suspension was mounted onto a Malassez chamber to count the RBC number and to follow the exflagellation process under microscope. Half of the sample was frozen in nitrogen liquid after 7 min of incubation at room temperature (RT) and the remainder after 15 min of incubation. Samples were stored at -80°C . All samples were prepared in biological triplicate. Purity was determined on Giemsa-stained smears (Figure 1).

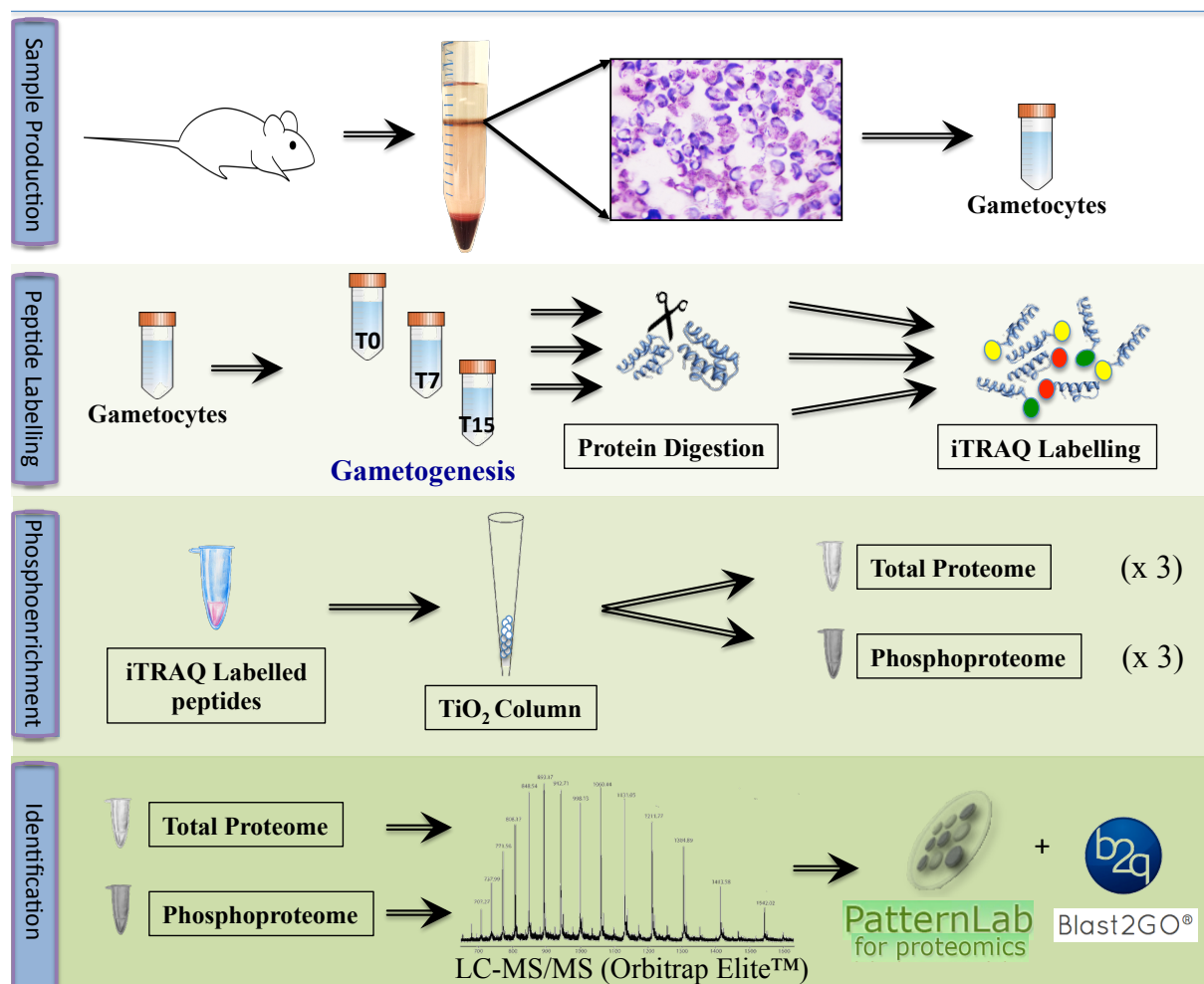


Figure 1. Experimental design and setup. *P. berghei* gametocyte-infected RBC were harvested, differentiation was triggered by xanthurenic acid-induction and then sampled in 3 distinct time points: 0 min, 7 min, and 15 min. For each time collected, the parasites were lysed in 8 M urea and then proteins were subjected to tryptic digestion. The resulting peptides were iTRAQ-labelled and mixed in 1:1:1 ratio. A sample aliquot was used for phosphopeptide

enrichment through TiO₂ micro-chromatography and both total and TiO₂ enriched peptide fraction were subjected to LC-MS/MS analysis.

2.2. Sample preparation for LC-MS/MS

Each sample was lysed in 10 volumes of 8 M urea containing a complete mixture of protease and phosphatase inhibitor, 2X Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X (Thermo Scientific), through three rapid cycles of freezing in nitrogen liquid and thawing on ice. Lysates were lyophilized and stored at -80°C until use. Lyophilized samples were resuspended in 100 mM TEAB (Fluka), vigorously vortexed and proteins were precipitated by ethanol/acetone. Briefly, each sample was vigorously vortexed and incubated overnight at -20 °C for protein precipitation. Sample was then centrifuged at 13,000 x g, 15 min, at 4 °C and the supernatant was discarded. The pellet was washed three times with ice-cold ethanol/acetone/water solution (4/4/2). Proteins were resolubilized in 8 M urea in 100 mM TEAB, centrifuged at 13,000 x g, 15 min, at 4 °C and the supernatant transferred into a new tube. Proteins were reduced by 20 mM DTT at RT for one hour and alkylated with 40 mM iodoacetamide for another hour. Proteins were first digested at RT by endoproteinase Lys-C (Sigma-Aldrich) for 12 hours with 0.01 AU for 100 µg of proteins. The solution was then diluted with 100 mM TEAB and 10% acetonitrile to a final urea concentration of 1M, supplemented with 1 µg of trypsin per 100 µg of proteins, Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega), for 4 h, at RT. The peptide sample was acidified with TFA 0,1% (v/v) final concentration and desalted using homemade 2 cm long microcolumns of Poros 20 R2 and Oligo R3 packed resins (Applied Biosystems) in p200 tips (Gobom et al., 1999). Peptides were eluted with 70% acetonitrile/0.1% TFA. Dried up peptides were solubilized in 300 mM TEAB and the concentration of the peptide solution was determined by Qubit® quantification assay (Thermo Fischer).

2.3. iTRAQ labelling

Peptides were labelled using 4-plex iTRAQ Reagent Multiplex Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 100 µg of peptides of each sample were resuspended in 25 µL of 300 mM TEAB; then, they were added to an iTRAQ label vial already prepared in 70 µL ethanol and incubated 2 h, at RT. Labelling configuration

was label 114: time 0, label 115: time 7 min, label 116: time 15 min. Labelling efficiency was controlled by micro-analysis by mass spectrometry for each labelled sample (1 μ L). After normalization, labelled samples were mixed in equal proportion.

2.4. Phosphopeptide enrichment

iTRAQ-labelled phosphopeptides were enriched in batch *via* TiO₂ affinity chromatography with minor modifications (Thingholm et al., 2006; Thingholm and Larsen, 2016). Briefly, iTRAQ-labelled multiplexed samples (around 280 μ g per biological replicate) were resuspended in 1 M glycolic acid in 80% acetonitrile/5% TFA (v/v), and 0.6 mg of TiO₂ beads per 100 μ g of peptide sample then incubated under vigorous shaking for 10 to 15 min. Beads were spun down and the supernatant was transferred to new microtubes. Additionally, a new bunch of TiO₂ beads was added to the supernatants (using 0.3 mg TiO₂ per 100 μ g of peptide); this procedure was done twice. The TiO₂ beads from the three rounds of enrichment were combined and washed twice with 80% acetonitrile/1% TFA (v/v) and then phosphopeptides were eluted by 0.28% ammonia solution, pH 11, and dried out.

2.5. LC-MS/MS

The enriched and non-enriched phosphopeptide fractions were analysed in biological triplicate with two technical replicates each, using a Dionex Ultimante™ 3000 RSLCnano system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) coupled online with an LTQ-Orbitrap Elite™ mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA). Samples were first loaded onto a 200 μ m x 100 μ m fused silica emitter trap column in-house packed with Reprosil-Pur 120 Å C18-AQ 5 μ m resine (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany) and then fractionated by 35 cm reverse phase capillary column made by fused silica emitter (75 μ m inner diameter) packed in-house with Reprosil-Pur 120 Å C18-AQ 3 μ m resine (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany). In brief, peptides in 0.1% (v/v) formic acid were injected onto the trap column with 98% solvent A (0.1% formic acid in water) and 2% solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile) under flow rate of 3 μ L/min. After washing, peptides were resolved over 210 minutes with 230 nL/min flow rate in analytical column through use of organic gradients: 2-40% solvent B until 170 min; and then 40-85% until 185 min; 85% until 190 min; and at

least 2% until 210 min. Peptides were ionized by Nanospray FlexTM ion source (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 2.5 kV and a capillary temperature of 275 °C.

2.6. Data processing

Data were acquired in a positive mode by Data-Dependent Acquisition (DDA) operated by the software Xcalibur 2.2 SP 1.78 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). DDA survey scans were set to 120.000 FWHM, m/z of 400, in the m/z range of 300 to 1800 and the top 15 multiply charged ions in each duty cycle selected for MS/MS fragmentation using higher-energy collisional dissociation (HCD) with a normalized collision energy of 50%, and 35% in technical replicate.

2.7. Data analysis

The PatternLab v.4.0.0.27 was used for identification and quantitative comparison of proteins as following procedures described in its bioinformatics protocol (Carvalho et al., 2016). The search used to compare experimental spectra against those theoretically generated from a sequence database using the embedded Comet MS/MS search engine v. 2015.020.

The database included 5,143 protein sequences of *P. berghei* ANKA downloaded from PlasmoDB, 55,957 sequences of *Mus musculus* downloaded from non-redundant NCBI, and 127 common contaminant sequences to proteomic experiments automatically included by PatternLab 4.0. The false discovery rate (FDR) was then estimated from reverse target-decoy sequence generated.

Peptide search parameters were as in accordance to PatternLab's protocol (Carvalho et al., 2016); the mass spectrometer raw files search considered all tryptic and semi-tryptic peptides candidates, a tolerance of two missed cleavages, carbamidomethylation of cysteines and N-terminus iTRAQ-4plex tagging of lysine residues as fixed modification, iTRAQ-4plex in tyrosine as variable modification, fragment bin tolerance of 1.0005 with an offset of 0.4 Da, M peak only as theoretical fragment ion and search range comprising the mass range of 550 to 5,500 Da. Phosphorylation of serine, threonine, and tyrosine amino acid residues as

variable modification were also considered in Peptide Spectrum Matches (PSMs) searches of phospho-enriched peptide datasets.

A statistical filtering and validation of peptide spectrum matches was performed using PatternLab Search Engine Processor in order to meet a subset of protein sequences that satisfies a FDR < 1%. Quantitation only considered proteins with at least two peptides and peptide with p-value < 0.05%. For phosphoproteome, one peptide was accepted as long as it had an XCorr > 2.5.

2.8. Gene Ontology

The functional categorization of proteins was assessed using Blast2GO software v.3.3.0 (Oracle Corporation). The primary sequence of each protein identified by PSM was exported from PatternLab in FASTA format and blasted by Blast2GO using default parameters with exception of Word Size of 3 and number of hits increased to 30. All alignments were done using BlastP v2.2.31+ service from CloudBlast (BioBam Bioinformatics S.L. Valencia, Spain) and all organisms in non-redundant NCBI database.

2.9. Ethical compliance

All the experiments using rodents in this study were carried out according to European regulations in compliance with the French guidelines and regulations, and approved by the Ethic Committee CUVIER (authorization n°68-007).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Proteome and phosphoproteome during gametogenesis

In order to perform a large-scale proteome and phosphoproteome analysis of the *P. berghei* sexual cells, strain NK65, during gametogenesis, we enriched gametocyte-infected RBC by NycoDenz gradient from blood of infected mice for each biological replicate, and

maintained in vitro in glucose-containing medium (CLB buffer) (Figure 1). Each enrichment had about 3×10^8 cells. Gamete differentiation (gametogenesis) was triggered by xanthurenic acid (Billker et al., 1998). Since gametogenesis is a rapid process occurring within minutes, parasite samples, once purified, were divided into 3 equal aliquots. One aliquot was immediately frozen in liquid nitrogen (time 0) and xanthurenic acid was added to the two others for 7 and 15 min and frozen. In our hands, no free male gametes or gametocytes under process of exflagellation were observed at time 0. Fifteen minutes after xanthurenic acid induction, budding male gametes from gametocytes with vigorous flagellar beating, associated with formation of characteristic nucleation centres with the surrounding cells, as well as free male gametes, were reproducibly observed.

Relative quantitative comparison overtime was performed by tryptic peptide iTRAQ labelling for the independent biological triplicates. Each replicate was analysed twice by a high-resolution nanoLC/MS-MS to increase the number of protein groups identified. The identification lists of high-confidence peptides and TiO₂-enriched phosphopeptides, with their respective iTRAQ reporter-ion intensities revealed modulations in protein and phosphorylation levels during the xanthurenic acid-induced gametogenesis. We identified 3,402 iTRAQ-labelled peptides mapping to 693 proteins assigned to *P. berghei* and *Mus musculus*, among which 2,617 iTRAQ-labelled peptides were assigned to 443 *P. berghei* proteins, according to FDR criterion of 0.15% for peptides and 0.57% for proteins (Suppl. Table S1).

All proteins identified from the parasite were found in all steps of the time course, probably due to the short interval between time points. Among them, 51 *P. berghei* proteins presented a statistically significant change in the modulation of abundance during gametogenesis (Table 1). Moreover, 566 *P. berghei* phosphopeptides were identified corresponding to 206 phosphorylated proteins (Suppl. Table S2), whose 39 proteins show a modulation of their phosphorylation status during gamete formation (Table 2). 92.7% of potential phosphoproteins identified after TiO₂-affinity enrichment were recovered in our proteome analysis (443 proteins) suggesting that more than 46.5% of gametocyte proteins were phosphorylated. This level of phosphorylated proteins is in accordance with that it is estimated that 1/10 to 1/3 of proteins are phosphorylated depending upon the cellular state (Weise and Lenz, 2008; Wu et al., 2009).

Table 1. *P. berghei* proteins with modulated abundance during xanthurenic acid-induced gametogenesis.

<i>Accession number (Plasmodium berghei ANKA) /protein</i>	Sequence Count	Spectrum Count	Avg Log Fold	Fold Change
Host cell hemoglobin degradation and proteolysis				
PBANKA_141030 M1-family alanyl aminopeptidase				
T0vsT15	2	8	0.425	1.53
PBANKA_103440 Plasmepsin IV				
T7vsT15	2	6	0.282	1.326
PBANKA_061030 Polyubiquitin				
T0vsT7	2	21	0.246	1.279
T0vsT15	2	13	0.34	1.405
PBANKA_144900 Aspartyl protease				
T0vsT7	8	88	-0.391	0.676
T0vsT15	9	85	-0.441	0.643
T7vsT15	2	9	-0.255	0.775
Energy metabolism				
PBANKA_130860 Fructose-bisphosphate aldolase 2 (ALDO2)				
T0vsT7	7	38	0.306	1.358
T0vsT15	8	56	0.176	1.192
PBANKA_130380 Triosephosphate isomerase (TIM)				
T0vsT15	2	10	0.111	1.117
PBANKA_132640 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)				
T0vsT7	8	50	0.208	1.231
T0vsT15	9	69	0.05	1.051
PBANKA_092810 Phosphoglycerate mutase (PGM1)				
T0vsT15	2	9	0.657	1.929
PBANKA_082340 Phosphoglycerate kinase (PGK)				
T0vsT15	2	16	0.033	1.034
PBANKA_121430 Enolase (ENO)				
T0vsT7	15	148	-0.167	0.846
T0vsT15	15	133	-0.116	0.89
T7vsT15	6	56	-0.029	0.971
PBANKA_112560 Pyruvate kinase (PK)				
T0vsT7	5	39	-0.202	0.817
T0vsT15	3	23	-0.466	0.628
T7vsT15	2	18	-0.297	0.743
PBANKA_134010 L-lactate dehydrogenase (LDH)				
T0vsT7	5	15	0.397	1.487
T0vsT15	3	14	-0.321	0.725
T7vsT15	2	11	-0.238	0.788
PBANKA_134040 Oxidoreductase				
T0vsT7	8	70	-0.339	0.712
T0vsT15	8	62	-0.281	0.755
PBANKA_145030 Mitochondrial ATP synthase subunit beta				
T0vsT7	3	12	-0.054	0.947
T0vsT15	3	14	-0.349	0.705
PBANKA_100380 Vacuolar ATP synthase subunit b				
T0vsT15	2	11	-0.328	0.72

Cytoskeleton and cell motility				
PBANKA_120690 Tubulin beta chain				
T0vsT7	13	102	0.117	1.124
T0vsT15	18	151	-0.014	0.986
T7vsT15	5	32	-0.249	0.78
PBANKA_041770 Alpha tubulin 1				
T0vsT7	5	36	-0.162	0.85
T0vsT15	6	42	-0.148	0.862
T7vsT15	2	12	-0.385	0.68
PBANKA_052270 Alpha tubulin 2				
T0vsT7	6	41	-0.165	0.848
T0vsT15	9	78	-0.196	0.822
T7vsT15	2	12	-0.385	0.68
PBANKA_083300 Profilin				
T0vsT15	2	19	-0.292	0.747
PBANKA_145930 Actin I				
T0vsT15	2	12	0.071	1.074
Nucleic acid and protein synthesis				
PBANKA_133190 Eukaryotic initiation factor 4a (eIF4A)				
T0vsT7	2	12	-0.206	0.814
T0vsT15	3	14	-0.259	0.772
PBANKA_113330/113340 Elongation factor 1-alpha (EF-1alpha)				
T0vsT7	10	105	-0.134	0.875
T0vsT15	12	127	-0.126	0.882
T7vsT15	2	10	0.04	1.041
PBANKA_131480 Elongation factor 2 (EF2)				
T0vsT7	5	31	-0.357	0.7
T0vsT15	5	30	-0.47	0.625
PBANKA_071260 14-3-3I protein				
T0vsT7	3	19	0.19	1.209
T0vsT15	4	22	0.037	1.038
T7vsT15	2	7	-0.306	0.736
PBANKA_120440 DNA/RNA-binding protein Alba 3				
T0vsT7	2	8	-0.302	0.739
PBANKA_142330 DNA/RNA-binding protein Alba 1				
T0vsT15	4	29	0.201	1.223
PBANKA_130130 Trailer hitch homolog (CITH)				
T0vsT15	2	16	0.059	1.061
T7vsT15	2	18	0.216	1.241
PBANKA_142690 RNA helicase				
T0vsT15	2	8	0.482	1.619
PBANKA_114170 Ubiquitin-60S ribosomal protein L40				
T0vsT7	3	24	0.025	1.025
T0vsT15	2	13	0.34	1.405
PBANKA_081990 nucleosome assembly protein (NAPS)				
T0vsT7	2	16	0.093	1.097
T0vsT15	3	21	0.202	1.224

PBANKA_101670 Conserved <i>Plasmodium</i> protein				
T0vsT7	2	14	0.505	1.657
T0vsT15	2	20	0.605	1.831
PBANKA_103390 40S ribosomal protein S8e				
T0vsT7	2	5	0.594	1.811
T0vsT15	2	5	0.632	1.881
PBANKA_135510 40S ribosomal protein S6				
T0vsT7	4	23	-0.304	0.738
T0vsT15	4	23	-0.352	0.703
PBANKA_140130 40S ribosomal protein S7				
T0vsT15	2	12	-0.42	0.657
PBANKA_141630 40S ribosomal protein S19				
T0vsT7	2	12	-0.362	0.696
PBANKA_123170 60S ribosomal protein L2				
T0vsT7	2	8	-0.298	0.742
T0vsT15	2	8	-0.369	0.691
PBANKA_020300 Chromatin assembly factor 1 protein WD40 domain				
T0vsT7	7	40	-0.153	0.858
T0vsT15	8	52	-0.166	0.847
T7vsT15	4	23	-0.135	0.874
PBANKA_094180 Histone H2B				
T0vsT15	2	8	-0.431	0.65
PBANKA_102230 mannose-1-phosphate guanyltransferase				
T0vsT7	2	15	-0.231	0.794
T0vsT15	2	15	-0.315	0.73
Membrane protein				
PBANKA_111340 Secreted ookinete protein (PSOP12)				
T0vsT7	2	22	0.071	1.074
T0vsT15	5	37	-0.042	0.959
Stress and protein folding				
PBANKA_121400 Heat shock protein 60 (HSP60)				
T0vsT7	2	7	-0.298	0.742
T0vsT15	2	9	0.012	1.012
PBANKA_071190 Heat shock protein 70 (HSP70)				
T0vsT7	10	122	-0.102	0.903
T0vsT15	13	151	0.036	1.037
T7vsT15	4	22	0.27	1.31
PBANKA_081890 Heat shock protein 70				
T0vsT7	8	62	-0.026	0.974
T0vsT15	7	63	0.027	1.027
T7vsT15	2	14	0.427	1.533
PBANKA_121930 Heat shock protein 110 (HSP110c)				
T0vsT7	4	24	-0.022	0.978
T0vsT15	3	23	-0.41	0.664
PBANKA_121650 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYP19A)				
T0vsT7	7	98	-0.396	0.673
T0vsT15	9	110	-0.451	0.637
T7vsT15	2	10	-0.265	0.767

PBANKA_143730 Endoplasmin (GRP94)				
T0vsT15	4	17	-0.46	0.631
PBANKA_070280 Protein disulfide isomerase (PDI)				
T0vsT7	8	44	-0.395	0.674
T0vsT15	6	59	-0.082	0.921
T7vsT15	2	5	-0.03	0.97
PBANKA_132090 Thioredoxin 1 (TRX1)				
T0vsT7	3	12	-0.008	0.992
T0vsT15	2	9	-0.236	0.79
PBANKA_112070 Nascent polypeptide associated complex alpha chain (NAC)				
T0vsT15	2	12	-0.373	0.689
PBANKA_112620 Protein DJ-1				
T0vsT15	2	6	0.339	1.404
PBANKA_111860 Cell division cycle protein 48 homologue				
T0vsT7	3	32	-0.244	0.783
T0vsT15	5	42	-0.313	0.731

Protein sequences satisfied a FDR < 1%. Quantitation only considered proteins with at least two peptides and peptide with p-value < 0.05%. Up regulated proteins are indicated in green. Down regulated proteins are indicated in red.

Table 2. *P. berghei* phosphoproteins with modulated phosphorylation during xanthurenic acid-induced gametogenesis.

Accession number (<i>Plasmodium berghei</i> ANKA)/protein	Sequence Count	Spectrum Count	Avg Log Fold	Fold Change
Host cell hemoglobin degradation and proteolysis				
PBANKA_144900 Aspartyl protease				
T0_T7	1	2	-0.295	0.745
Energy metabolism				
PBANKA_082340 Phosphoglycerate kinase (PGK)				
T7_T15	1	4	-0.498	0.608
PBANKA_092810 Phosphoglycerate mutase (PGM1)				
T0_T7	2	4	0.671	1.956
T7_T15	1	2	-0.529	0.589
PBANKA_130860 Fructose-bisphosphate aldolase 2 (ALDO2)				
T0_T7	1	4	0.236	1.266
PBANKA_132640 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)				
T0_T7	1	2	0.736	2.088
T7_T15	1	3	-0.23	0.795
PBANKA_134010 L-lactate dehydrogenase (LDH)				
T0_T7	1	6	-0.202	0.817
T0_T15	1	6	-0.302	0.739
PBANKA_111770 Malate dehydrogenase (MDH)				
T0_T7	1	4	0.224	1.251
T7_T15	1	4	-0.349	0.705
PBANKA_112560 Pyruvate kinase (PK)				
T7_T15	1	2	0.296	1.344
PBANKA_121430 Enolase (ENO)				
T0_T15	1	3	0.394	1.483
T7_T15	2	8	-0.026	0.974
Cytoskeleton and cell motility				
PBANKA_041770 Alpha tubulin 1				
T0_T7	3	9	0.365	1.441
T0_T15	3	9	0.418	1.519
T7_T15	1	3	0.207	1.230
PBANKA_052270 Alpha tubulin 2				
T0_T7	3	9	0.365	1.441
T0_T15	3	9	0.418	1.519
T7_T15	1	3	0.207	1.230
PBANKA_120690 Tubulin beta chain				
T0_T7	2	11	0.42	1.522
T0_T15	2	12	-0.379	0.685
T7_T15	3	14	-0.438	0.645
Nucleic acid and protein synthesis				
PBANKA_051700 Early transcribed membrane protein (ETRAMP10.2)				
T7_T15	1	5	0.234	1.264
PBANKA_020300 Chromatin assembly factor 1 protein WD40 domain				
T0_T7	1	3	1.04	2.829

T0_T15	2	11	0.253	1.288
PBANKA_101670 Conserved <i>Plasmodium</i> protein				
T0_T7	1	4	0.441	1.554
T0_T15	1	2	0.64	1.896
PBANKA_113330/113340 Elongation factor 1-alpha (EF-1alpha)				
T0_T7	3	18	-0.497	0.608
T0_T15	4	22	-0.314	0.731
T7_T15	2	13	0.226	1.254
PBANKA_113570 RNA-binding protein				
T0_T15	1	5	0.32	1.377
PBANKA_142330 DNA/RNA-binding protein Alba 1				
T0_T7	1	4	-0.448	0.639
T0_T15	1	4	-0.817	0.442
T7_T15	2	8	-0.345	0.708
PBANKA_142690 RNA helicase				
T0_T7	1	3	0.732	2.079
T0_T15	1	3	0.595	1.813
PBANKA_130130 Trailer hitch homolog (CITH)				
T0_T15	1	6	0.229	1.257
T7_T15	2	17	0.222	1.249
PBANKA_111300 Purine nucleoside phosphorylase (PNP)				
T0_T7	1	4	0.932	2.540
T7_T15	1	4	-0.96	0.383
PBANKA_093960 Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 (PAIP1)				
T0_T7	1	4	-0.963	0.382
T7_T15	1	4	0.269	1.309
PBANKA_082170 Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase				
T0_T7	1	3	-0.321	0.725
PBANKA_071260 14-3-3I protein				
T0_T15	2	6	-0.098	0.907
T7_T15	1	2	0.206	1.229
Exit from host cell				
PBANKA_143220 Male development gene 1 (MDV1)				
T0_T7	2	6	-0.215	0.807
T0_T15	2	5	-0.058	0.944
T7_T15	4	13	0.095	1.100
Stress and protein folding				
PBANKA_071190 Heat shock protein 70 (HSP70)				
T0_T7	1	3	0.843	2.323
T0_T15	2	13	0.287	1.332
PBANKA_081890 Heat shock protein 70				
T7_T15	1	7	-0.203	0.816
PBANKA_101950 60S ribosomal protein L5				
T0_T7	1	2	0.271	1.311
PBANKA_122120 60S ribosomal protein L34				
T0_T15	1	2	-0.602	0.548
PBANKA_135510 40S ribosomal protein S6				

T0_T7	1	3	0.242	1.274
PBANKA_140760 60S ribosomal protein L24				
T0_T7	1	2	-0.536	0.585
PBANKA_121650 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYP19A)				
T0_T15	1	3	-1.254	0.285
PBANKA_070280 Protein disulfide isomerase (PDI)				
T0_T15	1	4	0.391	1.478
PBANKA_111860 Cell division cycle protein 48 homologue				
T0_T7	1	2	-0.64	0.527
T0_T15	1	2	-0.547	0.579
Conserved <i>Plasmodium</i> protein with unknown function				
PBANKA_060430				
T7_T15	1	4	-0.217	0.805
PBANKA_093110				
T0_T15	1	2	-0.62	0.538
PBANKA_101670				
T0_T7	1	4	0.441	1.554
T0_T15	1	2	0.64	1.896
PBANKA_124440				
T0_T7	1	5	-0.277	0.758
T0_T15	1	5	-0.263	0.769
PBANKA_135630				
T0_T7	1	3	-0.248	0.780

Protein sequences satisfied a FDR < 1%. Quantitation only considered proteins with at least two peptides and peptide with p-value < 0.05%. For phosphoproteome, one peptide was accepted as long as it had an XCorr > 2.5. Up regulated proteins are indicated in green. Down regulated proteins are indicated in red.

3.2. GO analysis of proteome and phosphoproteome

A GO analysis according to the cellular component term revealed that 24% of proteins are assigned to integral membrane component and 24% of protein to ribosomal subunit or cytosolic ribosomal components. Others are related to organelles or vesicle compartments (mitochondria, nucleus, lysosome, plastid phagocytic vesicle and bounding organellar), and to cytoskeletal components (Figure 2A). The biological processes GO analysis revealed proteins related to RNA translation and protein biosynthesis to be the most prominent. Combined, they represent more than 50% of biological processes possibilities (Figure 2B). With term molecular function, proteins were associated within the cellular differentiation with binding function being the most recurrent: ATP, RNA, protein and metal ion binding proteins represent 61% (Figure 2C).

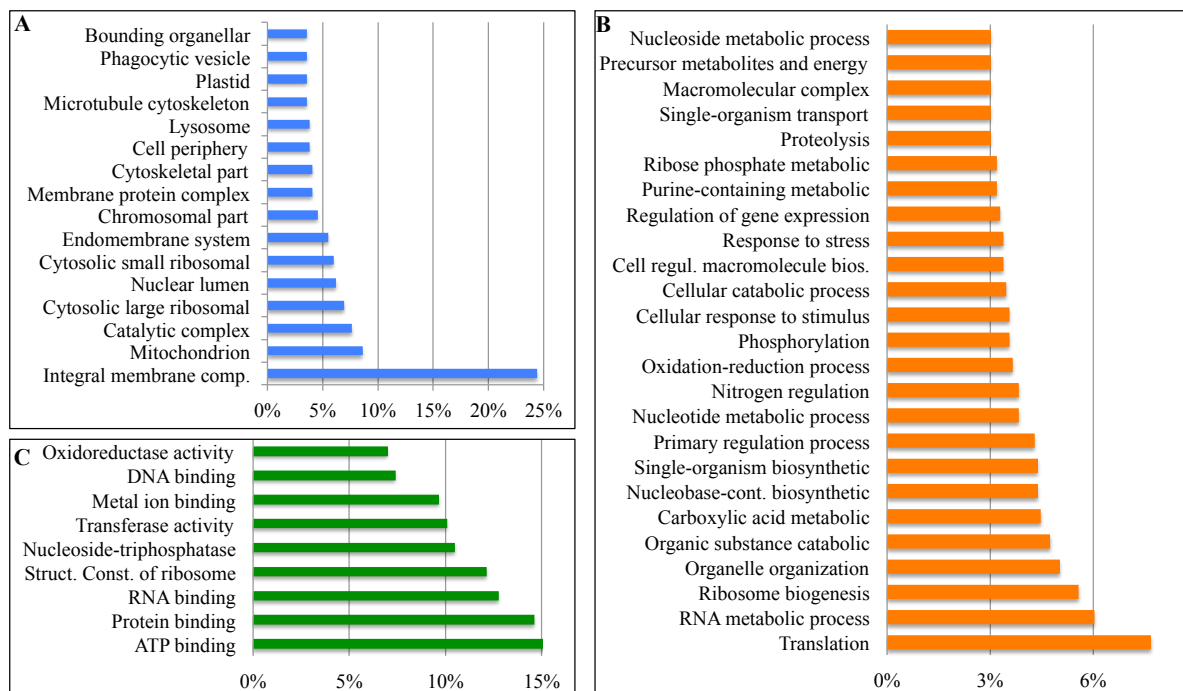


Figure 2. Gene Ontology terms from all identified proteins of *P. berghei* blasted in Blast2GO. Bars charts represent in percentage A) Cellular component; B) Biological process; C) Molecular function.

GO analysis of phosphoproteome reveals that phosphorylated proteins are mainly RNA or ATP or protein binding proteins or enzymes (Figure 3A). The vast majority of phosphoproteins identified are integral component of membrane (Figure 3B). The biological

processes related to RNA translation, protein biosynthesis, DNA biosynthesis, were clearly most prominent (Figure 3C).

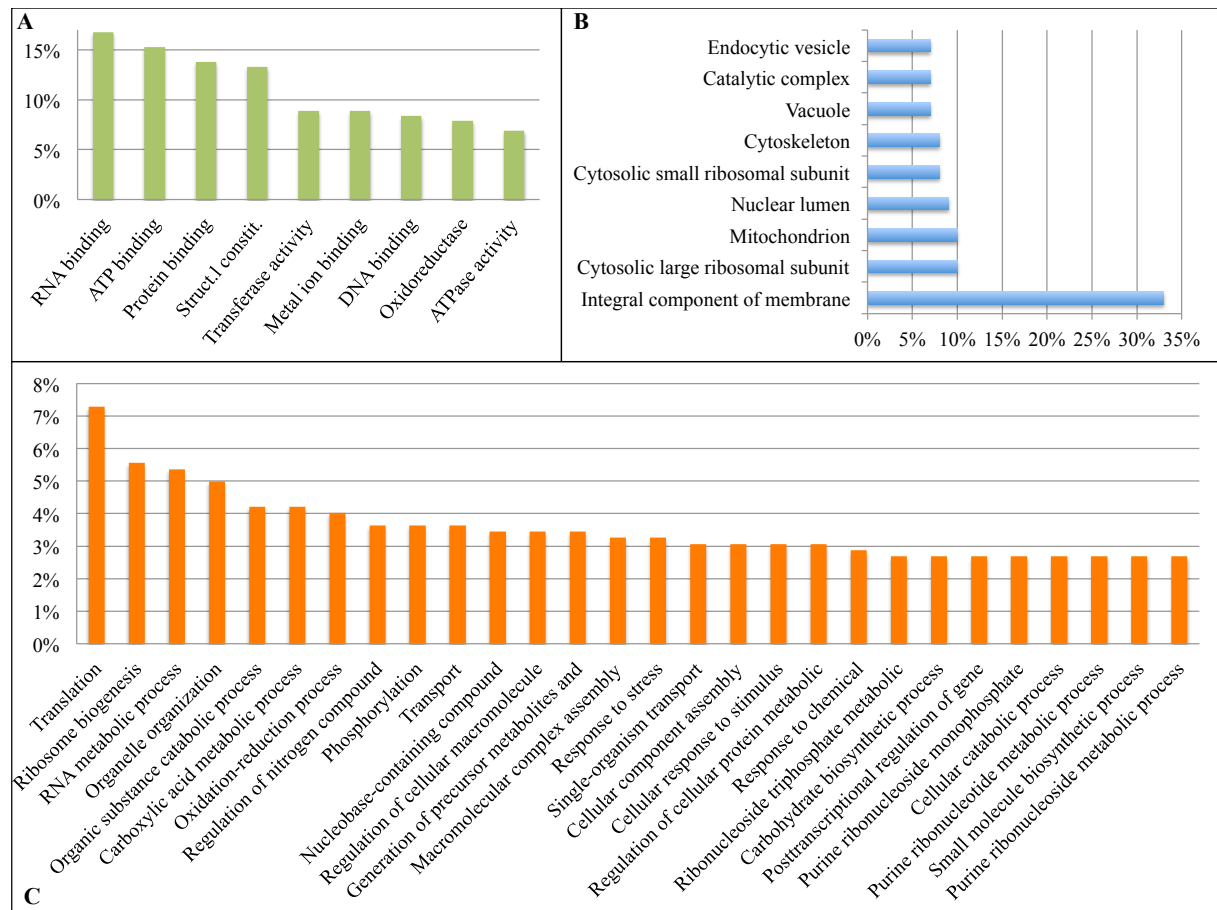


Figure 3. Gene Ontology terms from all phosphorylated proteins of *P. berghei* blasted in Blast2GO. Bars charts represent in percentage A) Molecular function; B) Cellular component; C) Biological process.

GO term cellular component analysis assessed a significant proportion of proteins related to biomembranes, showing that our sample preparation method was efficient in recovering hydrophobic proteins as previously described (Queiroz et al., 2014). Moreover the process and molecular function analysis correlates with a high involvement of parasite in metabolic activity, DNA translation, RNA/protein biosynthesis and cell reorganization.

3.3. Proteome and phosphoproteome modulations during the gametogenesis

Our results presented a relatively low number of proteins (51), corresponding to 11,7% of total identified proteins, showing a significant change in their abundance after xanthurenic acid-induction of the gametogenesis (Table 1). These proteins are mostly related to energy metabolism (11), response to stress or protein folding (11), proteolysis (4), constituents of ribosome/translation machinery (7) and cytoskeleton (5), have nucleic acid binding properties or participate to nucleosome assembly (8). Their fold change magnitudes are reflected in Table 1 and Suppl. Fig. 1-2.

The majority of the differentially abundant proteins (45) presented no major changes in abundance over the gametogenesis induction as observed for the increased content of alpha tubulins, proteins involved in protein folding and response to stress (e.g. CYP19A, PDI, HSP60, GRP94, HSP110c, TRX1), and structural constituents of ribosomes (e.g. EF2, 40S ribosomal proteins S6, S7 and S19, 60S ribosomal protein L2), or the decreased content of proteolytic activities (alanyl aminopeptidase, plasmepsin IV), part of the glycolysis enzymes (ALDO2, TIM, GAPDH, PGM1, PGK), and nucleic acid binding proteins (ALBA1, CITH, RNA helicase, NAPS). Furthermore, notable variations in abundance along the 15 minutes of induction were observed for LDH and beta tubulin (down expression during the first 7 min followed by an up expression) or heat shock protein 70 (up expression followed by down expression). Intriguingly, modulated proteins involved in a same biological pathway did not systematically show similar expression trends as for glycolysis enzymes or ribosomal proteins.

The 39 up and down phosphorylated proteins categorized mainly to the same biological functions reported for proteins with modulated abundance. However, most of the phosphopeptide modulations were independent of the corresponding peptide abundance profile. A linear regression analysis comparing the levels of modulation of phosphorylation to the whole proteome showed no correlation ($r = 0.185$) between them, leading us to hypothesize the phosphorylation patterns to be mostly related to functional processes rather than to the protein abundance. As exemplified by a decrease of phosphorylation of alpha tubulins, PK, PDI and 40S ribosomal protein S6 associated to an up expression, or the up phosphorylation of HSP 70, ALBA1, PGM1 associated to a down expression. Furthermore, 13 of these 39 phosphoproteins showed no modulation of their abundance.

3.4. Host cell haemoglobin degradation and proteolysis:

There are 2 proteases involved in both ‘haemoglobin catabolic process’ and ‘proteolysis’ of which expression is decreased during gametogenesis (Table 1). The aspartic protease Plasmepsin IV (PBANKA_103440) is well known to be involved in the initial step of hemoglobin degradation in the specialized digestive vacuole taking place during the asexual intra-erythrocytic stages of the *Plasmodium* parasite (Jones et al., 2011). In addition, Plasmepsin IV is expressed in the sexual stages (Hall et al., 2005; Young et al., 2005) and synergizes with the *Plasmodium* chitinase to facilitate ookinete invasion of the mosquito midgut and/or may be involved in the development of ookinete to oocyst (Li et al., 2010). The exo-aminopeptidase M1 Alanyl Aminopeptidase (PBANKA_141030) is essential for the release of amino acids from hemoglobin-derived peptides (Jones et al., 2011). The free amino acids are used by the parasite for protein synthesis and serves as a rich nutrient source for parasite metabolism. During gametocyte development, haemoglobin digestion occurs with production of hemozoin (Sinden, 1982). Our observation suggests that the parasite slows down degradation of haemoglobin once it initiates gametogenesis. That is supported by the reduced availability of haemoglobin when parasite egresses from RBC. Interestingly, it can be notified that the post-translational modification polyubiquitin (PBANKA_061030) is also down regulated during the gametogenesis. Lys48- and Lys63-linked polyubiquitins predominantly are involved in proteasomal degradation and cellular signalling, respectively (Kulathu and Komander, 2012).

3.5. Energy metabolism:

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis (Kanehisa and Goto, 2000) generated from BLAST2GO identified the main metabolic pathways during gametogenesis as: purine metabolism, pyrimidine metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, pentose phosphate pathway (PPP), glutathione metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism, and fructose and mannose metabolism. Such information shows the abundance of proteins connected to energetic metabolisms in sexual stages as previously mentioned (Wass et al., 2012; Talman et al., 2014).

Glycolysis - *Plasmodium* parasites rely on the glycolytic pathway to fulfil its energy requirements that makes the glucose consume increases in two magnitude orders when compared to uninfected RBCs (Mehta et al., 2005). Lactate, the ended metabolite, is excreted from the infected-RBC through parasite transporters and an enhanced RBC membrane permeability (Kanaani and Ginsburg, 1991;Marchetti et al., 2015;Wu et al., 2015). For sexual stages, glycolysis is the exclusive source of energy for motility of male gametes, which are devoid of mitochondria and apicoplast (Slavic et al., 2011;Talman et al., 2014). Importance of this pathway for sexual stages is supported by the identification of all 10 glycolytic enzymes with a high abundance in the present work (Table 1). Glycolysis is the main energy source for parasite rapid growth and reproduction (MacRae et al., 2013;Marchetti et al., 2015;Wu et al., 2015).

Pentose phosphate pathway - PPP is a key route for another energy generating pathway through recruitment of intermediates derived from glucose-6-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate, (Stincone et al., 2014). PPP is the major pathway for the recycling of NADP⁺ to NADPH, what has some importance on host-parasite relationship and rapidly proliferation since it keeps a pool of NADPH that serves as reducing power to protection against oxidant stress (Barrett, 1997). Indeed, reducing intracellular environment is of greater importance for *Plasmodium* subjected to reactive oxygen species (ROS). Besides redox balance, ROS are important for anabolism, cellular carbon homeostasis by generation of precursors for amino acid biosynthesis as well as for nucleotide synthesis, Pyrimidine and Purine metabolism (Barrett, 1997;Kruger and von Schaewen, 2003;Kovarova and Barrett, 2016), also reported here as pathways most present in sexual stages.

Oxidative phosphorylation - As observed in the intraerythrocytic asexual stages, the oxidative phosphorylation in sexual stages should be attenuated by high concentration of glucose (Seeber et al., 2008). That is supported by the identification of only 5 enzymes involved in oxidative phosphorylation in the present study. MacRae, et al provide insights that besides glycolysis and PPP, tricarboxylic acid pathway (TCA) can metabolise pyruvate but only contribute to a small fraction of the total cell energy production, the main part of pyruvate being converted to lactate and disregarded (MacRae et al., 2013). Beside ATP production, electron transport chain (mETC) and additional enzymes (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, type-II alternative NAD(P)H dehydrogenase, dihydroorotate dehydrogenase and malate:quinone oxidoreductase) serve other purposes, such as balancing the

NAD⁺/NADH ratio or reducing intermediates for the pyrimidine synthesis (Zikova et al., 2016). mETC regenerates ubiquinone and thus is essential for the activity of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), a key step in de novo pyrimidine biosynthesis (Jacot et al., 2016). mETC enzymes, FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase (PBANKA_040480) and malate dehydrogenase (PBANKA_111770), were identified in the present study (Suppl. Table S1) suggesting that these mETC complementary functions are effective in sexual stages.

Tricarboxylic acid cycle - TCA cycle enzymes were identified in the present study. TCA cycle is essential for sexual stages since its inhibition led to arrested development and death (MacRae et al., 2013). A conventional TCA cycle must thus operate in the insect stages despite lacking a recognizable mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex that converts pyruvate into acetyl-CoA used by TCA cycle to carry out cellular respiration. That complex links glycolysis to TCA. However, we identified in the present study a second *P. berghei* mitochondrial dehydrogenase complex, the branched chain ketoacid dehydrogenase (BCKDH) complex composed of BCKDHB (PBANKA_110420), BCKDH-E2 (PBANKA_040230) and -E3 (PBANKA_144690). Normally involved in branched amino acid catabolism in *Plasmodium*, BCKDH is required to convert pyruvate to acetyl-CoA and further catabolize glucose in the TCA cycle (Oppenheim et al., 2014). While aconitase activity is essential during gametocytogenesis of *P. falciparum* (Ke et al., 2015), this protein was not identified in our study. However, we detected the alpha and beta subunits of the mitochondrial ATP-specific succinyl-CoA synthetase (PBANKA_093850 and PBANKA_101320). Since TCA cycle is intimately linked to mETC, we can suppose that *P. berghei* sexual stages possess TCA cycle and mETC linked to glycolysis by pyruvate oxidation. Consequently, complete oxidation of glucose could then happen in the mitochondrion allowing higher ATP production through the mitochondrial ATP synthase (PBANKA_142180 and PBANKA_145030) than just by aerobic fermentative glycolysis. These data are in consonance with Sturm et al.'s work (Sturm et al., 2015) showing that mitochondrial ATP synthase is dispensable in asexual blood stages of *P. berghei* but essential for transmission to the mosquito vector.

Modulation of expression and phosphorylation during gametogenesis. – Significant modulations of 8 over the 10 glycolytic enzymes were observed during all the gametogenesis induction (Table 1). Intriguingly, there is a decreased expression of 5 enzymes of the 8 first

steps of glycolysis (ALDO2, TIM, GAPDH, PGK, PGM1) and an increased expression of the ENO and PK, the two last enzymes of the pathway. LDH shows down expression within the 7 first minutes followed by an up expression. Furthermore, excepted for TIM, modulations of their phosphorylation levels were observed (Table 2). Phosphorylation can be transitory as observed for PGM1 (PBANKA_092810) where a rapid global down phosphorylation is measured within the first minutes followed an increase of the phosphorylation level, indicating that gametogenesis induction does not only imply an intriguing modulation of expression of glycolysis enzymes but also a highly dynamic phosphorylation pattern. The overall consequences of such a differential expression on the glycolysis metabolism and the importance of phosphorylations in the regulation of the enzyme activities need to be deciphered.

It is reasonable to argue that in the face of a high demand for ATP for gamete differentiation and due to a decrease of available glucose content in the surrounding environment *in vivo*, the parasites increase the lactate and pyruvate metabolism for conversion of lactate into acetyl CoA until ATP production by the ATP synthase. Interestingly, an up expression of the oxidoreductase (PBANKA_134040), a putative LDH-like enzyme, was observed during gametogenesis and could amplify the LDH activity for converting lactate into pyruvate and its mobilisation into TCA cycle. This enzyme is absent in the asexual blood stage and mainly present in male gametocytes according to plasmoDB.

3.6 Cytoskeleton and cell motility:

There is an increase of proteins associated to the GO term ‘organelle organization’ during gametogenesis (Figure 3). While actin I (PBANKA_145930) was slightly down regulated according to the Patternlab software, profiling (PBANKA_083300), an actin-binding protein participating in the actin sequestration and the incorporation of monomers into filamentous actin polymers (Kursula et al., 2008), is up regulated. It indicates a dynamic turnover and restructuring of the actin cytoskeleton during gametogenesis. Actins plays essential roles during gametocyte maturation (Hliscs et al., 2015) and gametogenesis, particularly for gamete male exflagellation (Deligianni et al., 2011).

During male gametogenesis, tubulins are essential compounds for mitotic spindles required for the three rounds of DNA replication and endomitosis, and for the *de novo* assembly of the 8 male gamete axonemes. Alpha-tubulin 1 and beta tubulin are expressed in all blood and mosquito stages, but alpha-tubulin 2 is highly expressed in male gametocytes (Rawlings et al., 1992). A global increase of abundance of tubulins is observed during gametogenesis with a consistent increase of alpha tubulin 1 and 2 expression and a transient beta tubulin expression with a down regulation in the first minutes of induction followed by an up regulation. Endomitosis and axoneme assembly are rapid processes taking place in minutes, which required important amounts of tubulins. Our observations suggest that such a rapid tubulin mobilisation required for those events is not due, at least not only, to the presence of a pre-synthesized pool of tubulins, but is dependant of a rapid tubulin synthesis once gametogenesis is induced.

The heterodimer of alpha and beta tubulins have abundant and unique post-translational modifications (PTM), such as detyronisation, polyglutamylation, polyglycylation, acetylation, ubiquitylation, O-GlcNAcylation and phosphorylation, which play important roles in the regulation of various microtubule functions and associated proteins and motors. Phosphorylation is involved in the regulation of microtubule stability, dynamic and interaction with microtubule-associated proteins (Liu et al., 2015). Tubulin PTMs and their functional insights have been poorly investigated in *Plasmodium* (Read et al., 1993;Kooij et al., 2005;Fennell et al., 2008). Tubulins are highly conserved amongst Eukaryotes. *In silico* analysis, 19 of the 22 reported phosphorylation sites of human alpha tubulin (Liu et al., 2015) are identified in *P. berghei* alpha tubulins. In the present study, nine phosphorylation sites were recovered in the purified *Plasmodium* alpha tubulin phosphopeptides (Suppl. Fig. 3). Interestingly, potential new sites of phosphorylation of alpha tubulin 1 and/or 2 (phosphopeptide 2), alpha 1 (phosphopeptide 6) and alpha tubulin 2 (phosphopeptide 8, phosphopeptide 9) were identified (Suppl. Fig. 3). Twenty one of the 24 phosphorylation sites reported in human beta tubulin (Liu et al., 2015) are identified in *P. berghei* beta tubulin. Seventeen phosphorylation sites were recovered in the purified *Plasmodium* beta tubulin phosphopeptides and potential new sites of phosphorylation were identified (phosphopeptide 1; phosphopeptide 10) (Suppl. Fig. 4).

A global decrease of phosphorylation content of alpha tubulins is observed during gametogenesis whereas their abundance increases (Table 2). These changes are rapid

occurring within the first minutes of induction, but also can be transient as observed for phosphopeptide 1 (Suppl. Fig. 3), indicating a highly dynamic phosphorylation process through gametogenesis. It is however not possible to assign them to a particular isotype since phosphopeptides concerned are conserved between alpha tubulins 1 and 2. It is to notice that no modulation of phosphorylation was observed for the specific alpha tubulin 2 phosphopeptides identified. This overall decrease in phosphorylation is intriguing since phosphorylation is generally associated to an increase stability of microtubules (Liu et al., 2015) that was expected for the assembly of male gamete axonemes.

The abundance variation of beta tubulin phosphopeptides follows the same variation for the whole protein abundance profile (Table 2). However, a different timing for its phosphorylation events is observed with a decrease phosphorylation of phosphopeptides 1 and 2 within the first 7 min followed by an increase phosphorylation of phosphopeptides 2 and 3, and an overall decrease of phosphorylation of phosphopeptide 4 (Suppl. Fig 4). From these observations emerge that complex and dynamic patterns of tubulin phosphorylation and certainly other PTMs occur during gametogenesis. Phosphorylated amino acids within phosphopeptides need to be identified and functionally analysed, as well as for other PTMs. Alpha and beta tubulins were shown to be phosphorylated by serine/threonine kinases (Wloga and Gaertig, 2010), but our understanding of their functional relevance stays limited excepted for specific sites such as the Cdk1 phosphorylation of S172 of beta tubulin, which inhibits polymerization (Fourest-Lieuvin, 2005). A recent study mapped conventional PTMs (phosphorylation, acetylation, ubiquitylation, and O-GlcNAcylation) on tubulin purified from HeLa cells and functionally characterized PTM sites (Liu et al., 2015). It enlarges the view how distinct biochemical activities and cellular functions of microtubules can be encoded by PTMs.

3.7 Nucleic acid-binding proteins and protein synthesis

Protein synthesis - A marked increase of the abundance of initiation and elongation factors (eIF4A, EF-1 alpha, EF2), as well as numerous ribosomal proteins, excepted for the 40S ribosomal protein S8e, is observed within the first minutes of gametogenesis induction (Table 1), indicating that entry in gametogenesis is accompanied by an increase of protein synthesis. However, this increase is compelled to a limited set of proteins such as tubulins.

Female gametocyte are known to store repressed mRNAs that may be quickly activated in an ordered progression upon activation of gamete formation (Khan et al., 2005). Such a regulation may explain the rapid cell differentiation (within 15 min) observed in female and male gametocytes when gametogenesis is engaged. Interestingly, modulation of the level of phosphorylation of ribosomal proteins is also observed during gametogenesis. However, excepted for EF-1 alpha, ribosomal proteins concerned (40S ribosomal protein S6, 60S ribosomal protein L5, L24, L34) do not show modulation of their abundance (Table 2). Are these modulations of phosphorylation important in the renewal of protein synthesis stay to be deciphered?

DNA/RNA-binding proteins - Thirteen different gene families of RNA-binding proteins (RBPs) are reported in *Plasmodium*, corresponding to 3.5% of all annotated genes (Reddy et al., 2015). Interestingly we identified expression level modulation of RBPs belonging to the prominent classes, DEAD/H-box RNA helicase, acetylation lowers binding affinity proteins (Alba) and trailer hitch homolog protein (CITH). A decrease expression of RNA helicase (PBANKA_142690), Alba 1 (PBANKA_142330) and CITH (PBANKA_130130), and an increase expression of Alba 3 (PBANKA_120440) (Table 1) were measured during gametogenesis concomitant to a global dephosphorylation of RNA Helicase and CITH and an important increase of phosphorylation of Alba 1 (Table 2).

RNA helicases of *P. falciparum* were assigned to ribosome biogenesis and related, pre-mRNA processing, RNA degradation, mRNA turnover, genome repair and maintenance, and post-transcriptional regulation (Reddy et al., 2015). Alba proteins act as non-histone substrates for DNA regulation (Jelinska et al., 2005;Goyal et al., 2012), and for RNA regulation (Bunnik and Le Roch, 2015;Vembar et al., 2015). When acetylated, Alba became unable to inhibit transcription or translation (Goyal et al., 2012;Goyal et al., 2016). Alba proteins seem to occupy major chore because their function on translation and transcription regulation for differentiation and development (Goyal et al., 2016). Alba proteins were described as evenly expressed in all intraerythrocytic stages of *P. falciparum* (Goyal et al., 2012) and in zygote messenger ribonucleoprotein particles (mRNP) complex (Mair et al., 2010). CITH is a *Plasmodium* protein containing domain LSM14 and extended FDF motif known to compete with the enhancer of mRNA decapping EDC3 for binding to DDX6 helicases. Phenotype analysis of mutants lacking expression of CITH indicates that CITH plays an important role in translational repression of mRNAs in female gametocytes (Mair

G.R., Janse C.J., Waters A.P, Leiden Malaria Research Group, Leiden University Medical Center, <http://pberghei.eu/index.php?rmgm=358>). Interestingly, RNA helicase DOZI and CITH are both essential for ookinete formation by stabilising translationally repressed mRNAs stored into quiescent mRNPs for translation at a later time in the female gametocyte (Mair et al., 2010). Furthermore, *P. berghei* Alba1-4 were associated with the DOZI and CITH translational repression complexes, confirming their roles in *Plasmodium* RNA biology (Mair et al., 2010). Our findings support that Helicase, CITH, Alba belong to translational repression complexes that stabilize mRNA until parasite is engaged in gametogenesis. Their down expression, certainly associated to the change of their phosphorylation status, participates to the renewal of protein synthesis observed when gametogenesis is induced.

Chromatin assembly factors- Histone H2B (PBANKA_094180) and chromatin assembly factor 1 protein WD640 domain (PBANKA_020300) show an increase expression during gametogenesis. In contrary, Nucleosome Assembly Protein (NAPS) (PBANKA_081990) is down expressed (Table 1). Only chromatin assembly factor 1 show a significant phosphorylation modulation (decrease). H2B is known to be ubiquitylated, methylated, acetylated and phosphorylated in the asexual intraerythrocytic parasite (Saraf et al., 2016) and is described as important for host-interaction, growth and virulence in *P. falciparum* asexual stages (Luah et al., 2010). Its abundance raised until the mature gamete stages and would be tied up with post-replication DNA repair (Martini et al., 2002). According to Khan et al. (Khan et al., 2005), NAPS, also with function associated to Alba, FACT (Facilitates Chromatin Transcription) and H2B, is highly expressed in mature male gametocytes. Our observation states that NAPS has a relative declined abundance along all gametogenesis steps. Since gametocytes are under replication and differentiation processes, it makes sense that NAPS would be repressed and DNA freely available for replication and transcription. NAPS interact with H2B histone for DNA assembly and disassembly (Pace et al., 2006; Gill et al., 2010; Ransom et al., 2010; Laurentino et al., 2011). Nevertheless, the Chromatin assembly factor protein WD40 observed herein and that probably has coordinated function associated to NAPS, was observed with abundance broadened.

14-3-3 Proteins – They are a family of conserved regulatory proteins expressed in all eukaryotic cells. They interact with proteins displaying recognition motifs containing phosphorylated serine or threonine and play a major role in cellular regulation networks. Two putative 14-3-3 proteins are highly expressed during the asexual *Plasmodium* cycle. *P.*

falciparum 14-3-3I is present in both cytoplasmic and nuclear compartments of the intraerythrocytic parasite and has been identified as a histone H3 phosphorylation reader (Dastidar et al., 2013). Here, the observation of a transient down and up expression of *P. berghei* 14-3-3I protein (Table 1) associated to an inverse up and down phosphorylation status (Table 2) suggests a prevalent histone phosphorylation in the control of nuclear processes during the gametogenesis.

3.8 Stress and protein folding

Heat shock proteins and other chaperones are abundant and ubiquitous throughout the *Plasmodium* entire life cycle (Feder and Hofmann, 1999) and constitute almost 2% of *P. falciparum* genome (Acharya et al., 2007). It performs housekeeping functions and a broad range of cellular processes ranging from the help to newly synthesized proteins to fold or on protein refolding, protein complex-assembling and disassembling, protein trafficking, signal transduction and degradation (Acharya et al., 2007;Shonhai, 2010). That allows the parasite to adapt itself to temperature changes, growth and differentiation. Furthermore, chaperones participates on motor proteins regulation as kinesins (Tsai et al., 2000;Gindhart, 2006) that are crucial for male differentiation development (Talman et al., 2014).

Our findings show that entry in gametogenesis of *P. berghei* is accompanied by an increase expression of stress and folding proteins (Table 1) as exemplified by the increase expression of the oxidative stress proteins, thioredoxin 1 (PBANKA_132090) and DJ-1 (PBANKA_112620) to minimize the oxidative damage. *Plasmodium* DJ-1 has been suggested important in parasite development (Singhal et al., 2014). DJ-1 functions are still poorly understood but certainly acts as redox sensor and regulates the process of microneme secretion in *Toxoplasma* (Hall et al., 2011). Interestingly, we also observe the increasing of the alpha chain of the nascent polypeptide associated complex NAC (PBANKA_112070), which is a conserved eukaryote heterodimeric and multifunctional protein, involved in stress response (chaperone activity), assembly and transport of proteins, ribosome biogenesis, and apoptosis regulation. Moreover, the homodimeric alpha NAC could act as a transcription factor (Kogan and Gvozdev, 2014). According to plasmoDB, this protein is present in female gametocyte, suggesting that it could play a major role in macrogametogenesis.

The chaperone Hsp110c (PBANKA_121930) relative abundance was increased through gametogenesis whereas Hsp60 (PBANKA_121400) and Hsp70s (PBANKA_071190 and PBANKA_081890) exhibit a transient expression with an up expression within minutes of gametogenesis induction followed by an ending down expression. Hsp110c is localized in *Plasmodium* cytoplasm and probably acts as nucleotide exchange factor for cytosolic Hsp70 and performs chaperone activity to maintain substrate in folding competent states as for *P. falciparum* Hsp110 (Pallavi et al., 2010;Zininga et al., 2016) to prevent asparagine repeats proteins aggregation (Muralidharan et al., 2012). Increase expression of GRP94 endoplasmic (PBANKA_143730), peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PBANKA_121650) and protein disulphide isomerase PDI (PBANKA_070280) was also measured that reflects an increased protein folding activity associated to the rapid increase of protein biosynthesis activity and probably related to cellular need for keeping proteins in competent state (Pallavi et al., 2010). Phosphorylation modulation was observed for PDI, Hsp70s and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (Table 2). Endoplasmic with other chaperones including the CDC48 homologue protein (PBANKA_111860), a subunit of polyubiquitin-selective segregase complex, with an up regulated expression (Table 1) and which is phosphorylated (Table 2), are involved in the proteasome-mediated process known as ER-associated degradation (ERAD) of misfolded proteins. ERAD could compensate for *Plasmodium* a lack of conventional transcriptional regulation and the little coordinated response to internal or external perturbations (Bozdech et al., 2003;Harbut et al., 2012).

3.9 Exit from host cell

Gametogenesis is associated to the egress of both differentiated male and female gametocytes outside RBC requiring lysis of the parasitophorous vacuole membrane and the erythrocyte membrane. This sequential membrane lysis requires the exocytosis of specialized secretory vesicles called osmophilic bodies. In *P. berghei*, this egress process occurs in few minutes and is important for male gamete exflagellation, fertilization and parasite transmission to mosquito. Egress involved different proteins that begin to be identified (Kehrer et al., 2016) including for the best characterized: the male development gene 1 (MDV1/PEG3), the G337 protein, the perforin-like protein PPL2 and the gamete egress and sporozoite traversal protein GEST. In our study, MDV1 phosphorylation status was found highly modulated during the 15 min-induced gametogenesis with an increase phosphorylation

of the peptide 132AADLLDKNLESALKPLIENKSFDK155 within the 7 min of induction followed by a decrease phosphorylation of the peptide 74NKDLDDIKDDLASELATAK91 and an increase of phosphorylation of the peptide 116NLKIYVKEISGYVGLK131. MDV1 encodes for a 24 kDa protein colocalized with G337 and GEST in osmophilic bodies of male and female gametocytes. MDV1 is conserved in *Plasmodium* spp. MDV1-deleted parasites show no or few osmolytic bodies and defect in erythrocyte and parasitophorous membrane lysis, leading to low parasite transmission to mosquito (Ponzi et al., 2009). Our observations support that phosphorylation processes are likely involved in the egress process.

Interestingly, the aspartyl protease PBANKA_144900 is found up regulated along the gametogenesis. This uncharacterized protease was recently identified associated to osmolytic bodies, but not essential for parasite egress and ookinete formation (Kehrer et al., 2016). Its function in the egress process is unknown. It must be notified that a set of chaperones (endoplasmic, Hsp70, Hsp110) that we observed up regulated during gametogenesis, were also identified in the osmophilic body proteome. The authors suggested that these chaperones should be likely involved in trafficking and folding of MDV1 (Kehrer et al., 2016).

4. CONCLUDING REMARKS

P. berghei gametogenesis is a rapid and complex process that results in a drastic transformation from quiescent gametocytes whose maturation is blocked in blood vertebrates to differentiated male and female gametes, a process taking place within 15-20 min in mosquito gut once sexual stages were ingested during the blood meal. In this short period of time, gametogenesis involved egress of parasites from RBC and for male gametocytes, a spectacular differentiation process requiring three rounds of DNA replication, intracytoplasmic assembly of axonemes and exflagellation of male gametes. Although extensively studied, our knowledge of molecular events associated to gametogenesis is still superficial. Here, we induced gametogenesis using xanthurenic acid and performed a differential quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis, using isobaric labels, of different time points of the gametogenesis.

We were able to identify a significant modulation of the expression of 51 proteins during gametogenesis, corresponding to 11.7% of total identified proteins. Function analysis

of these proteins suggested the following biological processes associated to the course of the gametogenesis: 1) a marked reduced expression of the first enzymes of glycolysis associated to an up expression of the last enzymes of this pathways, LDH-like proteins and mitochondrial ATP synthase, suggesting an increase of the pyruvate and lactate metabolism for ATP production through TCA cycle and mETC; 2) an important increase of tubulin abundance that is required for the mitotic spindle and axoneme assembly, as well a possible restructuring of the actin cytoskeleton; 3) a slow-down haemoglobin digestion; 4) an increase of protein synthesis reflected by the increase abundance of initiation and elongation factors and ribosomal proteins; 5) a decrease expression of proteins potentially involved in translationally repressed mRNAs; 6) a modulation of the expression of chromatin interacting factors of which roles stay to be deciphered; 7) an involvement of proteins associated to stress response, chaperone activity and protein folding/refolding.

Thirty-nine proteins showed phosphorylation modifications during gametogenesis. Deeper investigations indicated that some proteins have highly dynamic and changing patterns of phosphorylation during the course of the gametogenesis. Phosphorylation/dephosphorylation process is known to be important to regulate protein functions. It is thus tempting to hypothesize that these post-translational modification modulations have important roles in the biological processes observed associated to gametogenesis. This proteomic study supports that *P. berghei* gametogenesis would be controlled by epigenetic modulations and the progressive breaking down of the translational repression of mRNAs allowing a quiescent and pre-prepared gametocytes to respond to environmental conditions and entry in gamete differentiation.

SUPPLEMENTARY DATA

Suppl. Table S1. *P. berghei* and proteins identified during gametogenesis. The lengths are indicated by number of amino acid residues.

Accession number	#Unique Peptides	MW	Sequence Count	Spectrum Count	Coverage	Description
PBANKA_071190	64	75155.0	70	525	0.665	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70 (HSP70) protein length=693
PBANKA_120690	54	49739.9	57	410	0.852	Plasmodium berghei ANKA tubulin beta chain, putative protein length=445
PBANKA_121430	49	48977.4	52	305	0.818	Plasmodium berghei ANKA enolase, putative (ENO) protein length=446
PBANKA_132640	47	36541.0	47	312	0.875	Plasmodium berghei ANKA glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, putative (GAPDH) protein length=337
PBANKA_113330	6	48909.9	44	327	0.731	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443
PBANKA_081890	41	72084.9	41	205	0.492	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70, putative protein length=651
PBANKA_070280	40	55358.1	40	220	0.598	Plasmodium berghei ANKA protein disulfide isomerase protein length=482
PBANKA_130860	40	39808.9	40	168	0.930	Plasmodium berghei ANKA fructose-bisphosphate aldolase 2 (ALDO2) protein length=369
PBANKA_144900	39	65322.5	39	165	0.504	Plasmodium berghei ANKA aspartyl protease, putative protein length=577
PBANKA_111860	36	90764.2	38	172	0.498	Plasmodium berghei ANKA cell division cycle protein 48 homologue, putative protein length=815
PBANKA_113340	0	48909.9	38	317	0.731	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443
PBANKA_131480	36	93297.2	38	100	0.414	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 2, putative protein length=832
PBANKA_020300	31	50481.8	31	143	0.601	Plasmodium berghei ANKA chromatin assembly factor 1 protein WD40 domain, putative protein length=446
PBANKA_052270	15	49669.3	31	216	0.567	Plasmodium berghei ANKA alpha tubulin 2 protein length=450
PBANKA_143920	29	93239.1	29	66	0.368	Plasmodium berghei ANKA polyadenylate-binding protein, putative (PABP) protein length=834
PBANKA_071260	27	30166.7	28	105	0.771	Plasmodium berghei ANKA 14-3-3 protein (14-3-3I) protein length=262
PBANKA_134010	27	34384.1	27	119	0.760	Plasmodium berghei ANKA L-lactate dehydrogenase (LDH) protein length=316
PBANKA_080570	26	83143.2	26	63	0.383	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 90, putative (HSP90) protein length=720
PBANKA_112560	26	55493.8	26	109	0.536	Plasmodium berghei ANKA pyruvate kinase, putative protein length=511
PBANKA_134040	25	36916.3	25	128	0.566	Plasmodium berghei ANKA oxidoreductase, putative protein length=334
PBANKA_121400	24	62189.5	24	56	0.544	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 60, putative protein length=579
PBANKA_145030	21	57830.3	24	77	0.580	Plasmodium berghei ANKA ATP synthase subunit beta, mitochondrial, putative protein length=533
PBANKA_130130	23	39026.9	23	128	0.623	Plasmodium berghei ANKA trailer hitch homolog, putative (CITH) protein length=337
PBANKA_142330	23	26845.5	23	123	0.496	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 1, putative (ALBA1) protein length=242
PBANKA_040520	22	59033.4	22	46	0.372	Plasmodium berghei ANKA T-complex protein beta subunit, putative protein length=533

PBANKA_121930	22	94821.3	22	77	0.200	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 110, putative (HSP110c) protein length=836
PBANKA_143730	22	93169.2	22	78	0.261	Plasmodium berghei ANKA endoplasmic reticulum chaperone, putative (GRP94) protein length=808
PBANKA_143220	21	24252.8	21	132	0.631	Plasmodium berghei ANKA male development gene 1 (MDV1) protein length=214
PBANKA_041770	4	50156.3	20	130	0.519	Plasmodium berghei ANKA alpha tubulin 1 protein length=453
PBANKA_082340	20	45448.1	20	96	0.514	Plasmodium berghei ANKA phosphoglycerate kinase, putative (PGK) protein length=416
PBANKA_101670	19	32689.7	19	70	0.541	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=279
PBANKA_111340	19	85042.1	19	71	0.194	Plasmodium berghei ANKA secreted ookinete protein, putative,6-cysteine protein (PSOP12) protein length=721
PBANKA_145930	18	41840.0	19	71	0.434	Plasmodium berghei ANKA actin I protein length=376
PBANKA_121470	18	111954.5	18	32	0.258	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=961
PBANKA_114170	3	14589.9	17	96	0.563	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-60S ribosomal protein L40, putative protein length=128
PBANKA_121650	17	18788.3	17	130	0.671	Plasmodium berghei ANKA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative (CYP19A) protein length=170
PBANKA_070470	16	57214.4	16	47	0.294	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=487
PBANKA_091440	16	73103.1	16	28	0.167	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70, putative (UIS24) protein length=663
PBANKA_061160	15	96972.0	15	37	0.216	Plasmodium berghei ANKA ribonucleoside-diphosphate reductase, large subunit, putative protein length=847
PBANKA_083100	15	198529.4	15	31	0.098	Plasmodium berghei ANKA merozoite surface protein 1 (MSP1) protein length=1791
PBANKA_093840	15	39080.3	15	35	0.474	Plasmodium berghei ANKA endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein, putative protein length=342
PBANKA_146300	15	309004.2	15	23	0.073	Plasmodium berghei ANKA osmiophilic body protein (G377) protein length=2606
PBANKA_060430	14	38739.5	14	43	0.403	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=330
PBANKA_061030	0	25685.8	14	73	0.314	Plasmodium berghei ANKA polyubiquitin, putative protein length=229
PBANKA_081990	14	31650.8	14	52	0.360	Plasmodium berghei ANKA nucleosome assembly protein (NAPS) protein length=267
PBANKA_130380	14	27807.4	14	39	0.407	Plasmodium berghei ANKA triosephosphate isomerase, putative (TIM) protein length=248
PBANKA_061920	13	54662.5	13	18	0.215	Plasmodium berghei ANKA secreted ookinete protein, putative (PSOP1) protein length=479
PBANKA_092810	13	28671.1	13	42	0.368	Plasmodium berghei ANKA phosphoglycerate mutase, putative (PGM1) protein length=250
PBANKA_093030	13	24852.8	13	48	0.425	Plasmodium berghei ANKA GTP-binding nuclear protein RAN/TC4, putative protein length=214
PBANKA_145780	13	33119.2	13	22	0.557	Plasmodium berghei ANKA ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, putative (ARFGAP) protein length=296
PBANKA_094180	12	13231.2	12	48	0.661	Plasmodium berghei ANKA histone H2B, putative (H2B) protein length=118
PBANKA_101050	12	65585.2	12	15	0.265	Plasmodium berghei ANKA Hsp70/Hsp90 organizing protein, putative (HOP) protein length=559
PBANKA_111300	12	26971.7	12	35	0.562	Plasmodium berghei ANKA purine nucleoside phosphorylase, putative (PNP) protein length=244
PBANKA_123170	12	27855.1	12	24	0.335	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L2, putative (RPL2) protein length=260
PBANKA_133190	12	45322.5	12	35	0.239	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic initiation factor 4a, putative (eIF4A) protein length=398

PBANKA_142690	12	104135.3	12	29	0.127	Plasmodium berghei ANKA RNA helicase, putative protein length=909
PBANKA_100380	11	55775.4	11	23	0.338	Plasmodium berghei ANKA vacuolar ATP synthase subunit b, putative protein length=494
PBANKA_111770	11	34273.8	11	34	0.489	Plasmodium berghei ANKA malate dehydrogenase, putative (MDH) protein length=313
PBANKA_130280	11	21622.3	11	33	0.421	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin peroxidase 1 (TPx1) protein length=195
PBANKA_135510	11	35429.9	11	57	0.326	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S6, putative protein length=310
PBANKA_030510	10	154804.4	10	16	0.076	Plasmodium berghei ANKA serine repeat antigen 1 (SERA1) protein length=1406
PBANKA_081420	10	29995.1	10	27	0.327	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-beta, putative protein length=257
PBANKA_091790	9	50927.3	10	22	0.279	Plasmodium berghei ANKA 26S protease regulatory subunit 6a, putative (RPT5) protein length=451
PBANKA_091800	10	34820.2	10	18	0.378	Plasmodium berghei ANKA 60S acidic ribosomal protein P0, putative protein length=315
PBANKA_103440	10	50432.6	10	36	0.247	Plasmodium berghei ANKA plasmepsin IV (PM4) protein length=450
PBANKA_121770	10	49325.6	10	30	0.122	Plasmodium berghei ANKA ATP-dependent RNA helicase DDX6 (DOZI) protein length=433
PBANKA_132090	10	11612.9	10	26	0.548	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin 1, putative (TRX1) protein length=104
PBANKA_140260	10	102620.0	10	13	0.071	Plasmodium berghei ANKA DNA ligase I, putative protein length=898
PBANKA_141040	10	68289.2	10	17	0.188	Plasmodium berghei ANKA vacuolar ATP synthase subunit a, putative protein length=611
PBANKA_144410	10	60779.0	10	17	0.164	Plasmodium berghei ANKA t-complex protein 1 gamma subunit, putative protein length=542
PBANKA_021150	9	28311.4	9	25	0.441	Plasmodium berghei ANKA proteasome subunit alpha type-5, putative protein length=256
PBANKA_051280	9	66720.1	9	14	0.094	Plasmodium berghei ANKA merozoite TRAP-like protein, putative (MTRAP) protein length=618
PBANKA_070390	9	35542.9	9	24	0.183	Plasmodium berghei ANKA receptor for activated c kinase, putative (RACK) protein length=322
PBANKA_093220	9	21179.1	9	27	0.438	Plasmodium berghei ANKA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative protein length=192
PBANKA_111520	9	132736.1	9	19	0.077	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1138
PBANKA_111700	8	14194.8	9	54	0.707	Plasmodium berghei ANKA histone H2A, putative (H2A) protein length=133
PBANKA_120060	9	250881.9	9	13	0.015	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=2206
PBANKA_142430	9	32548.1	9	29	0.387	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=284
PBANKA_040540	8	15434.0	8	17	0.394	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S12, putative protein length=142
PBANKA_050580	8	29223.5	8	19	0.328	Plasmodium berghei ANKA deoxyribose-phosphate aldolase, putative protein length=262
PBANKA_090360	8	93443.4	8	13	0.098	Plasmodium berghei ANKA dynamin-like protein, putative (DYN1) protein length=814
PBANKA_093420	8	41217.1	8	28	0.440	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin domain-containing protein DSK2, putative (DSK2) protein length=375
PBANKA_103270	8	58837.1	8	10	0.217	Plasmodium berghei ANKA RNA binding protein Bruno, putative (HoBo) protein length=507
PBANKA_103520	8	148090.1	8	10	0.049	Plasmodium berghei ANKA LCCL domain-containing protein (CCp3) protein length=1304
PBANKA_110670	8	46085.3	8	14	0.190	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L4, putative (RPL4) protein length=411

PBANKA_120440	8	11965.3	8	35	0.523	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 3, putative (ALBA3) protein length=107
PBANKA_122900	8	126199.2	8	9	0.057	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=1095
PBANKA_123100	8	16046.7	8	15	0.523	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S11, putative protein length=151
PBANKA_136030	8	42121.4	8	49	0.174	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 4, putative (ALBA4) protein length=374
PBANKA_145070	8	45627.5	8	13	0.171	Plasmodium berghei ANKA clustered-asparagine-rich protein, putative protein length=397
PBANKA_030490	7	123106.3	7	13	0.056	Plasmodium berghei ANKA serine repeat antigen 3 (SERA3) protein length=1096
PBANKA_030500	7	123889.8	7	12	0.078	Plasmodium berghei ANKA serine repeat antigen 2 (SERA2) protein length=1122
PBANKA_040470	7	12361.4	7	25	0.514	Plasmodium berghei ANKA glutaredoxin 1, putative (GRX1) protein length=109
PBANKA_060320	7	17524.7	7	36	0.398	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 5A, putative (EIF5A) protein length=161
PBANKA_082170	7	55844.6	7	13	0.172	Plasmodium berghei ANKA inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, putative protein length=507
PBANKA_091620	7	60078.6	7	18	0.147	Plasmodium berghei ANKA TCP-1/cpn60 chaperonin family, putative protein length=543
PBANKA_100950	7	336064.3	7	10	0.030	Plasmodium berghei ANKA NAD(P)H-dependent glutamate synthase, putative protein length=2962
PBANKA_103390	7	24959.3	7	18	0.211	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S8e, putative protein length=218
PBANKA_120720	7	27364.5	7	17	0.289	Plasmodium berghei ANKA adenylate kinase, putative (AK1) protein length=242
PBANKA_123210	7	36233.1	7	11	0.137	Plasmodium berghei ANKA pre-mRNA-splicing factor, putative (SR1) protein length=315
PBANKA_124180	7	107214.3	7	14	0.098	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM3, putative (MCM3) protein length=945
PBANKA_141030	7	123256.3	7	23	0.072	Plasmodium berghei ANKA M1-family alanyl aminopeptidase, putative protein length=1064
PBANKA_143105	7	10972.9	7	30	0.373	Plasmodium berghei ANKA 10 kDa chaperonin, putative (CPN10) protein length=102
PBANKA_145020	7	49575.4	7	19	0.122	Plasmodium berghei ANKA serine hydroxymethyltransferase, putative (SHMT) protein length=442
PBANKA_020160	6	18642.4	6	33	0.254	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein (ETRAMP) protein length=177
PBANKA_030130	6	9784.8	6	30	0.582	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=91
PBANKA_051190	6	44319.8	6	9	0.122	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L3, putative (RPL3) protein length=386
PBANKA_082670	6	25218.7	6	26	0.230	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=222
PBANKA_093770	6	12700.3	6	26	0.504	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L36, putative (RPL36) protein length=113
PBANKA_093960	6	368279.4	6	14	0.015	Plasmodium berghei ANKA polyadenylate-binding protein-interacting protein 1, putative (PAIP1) protein length=3296
PBANKA_101850	6	19905.6	6	17	0.339	Plasmodium berghei ANKA transcription factor 3b, putative protein length=174
PBANKA_101950	6	33843.2	6	26	0.215	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L5, putative protein length=293
PBANKA_103010	5	42609.2	6	10	0.098	Plasmodium berghei ANKA actin II protein length=376
PBANKA_111710	1	15413.6	6	14	0.279	Plasmodium berghei ANKA histone H3 variant, putative (H3.3) protein length=136
PBANKA_124440	6	9931.8	6	15	0.233	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=86

PBANKA_130070	6	183560.8	6	10	0.051	Plasmodium berghei ANKA LCCL domain-containing protein (CCp1) protein length=1615
PBANKA_131080	6	29901.8	6	15	0.292	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S5, putative protein length=271
PBANKA_132930	6	24702.5	6	10	0.131	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S3, putative protein length=222
PBANKA_135440	6	21668.5	6	12	0.179	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L18, putative protein length=184
PBANKA_140960	6	59450.3	6	12	0.105	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=484
PBANKA_141910	6	47783.5	6	13	0.135	Plasmodium berghei ANKA dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, putative protein length=423
PBANKA_144680	6	79764.8	6	6	0.031	Plasmodium berghei ANKA 60 kDa chaperonin, putative (CPN60) protein length=707
PBANKA_010880	0	15418.5	5	13	0.279	Plasmodium berghei ANKA histone H3, putative protein length=136
PBANKA_020450	5	121466.2	5	12	0.025	Plasmodium berghei ANKA LCCL domain-containing protein (CCp5) protein length=1049
PBANKA_031000	5	38079.2	5	15	0.084	Plasmodium berghei ANKA heat shock 40 kDa protein, putative protein length=334
PBANKA_031100	5	156519.8	5	8	0.027	Plasmodium berghei ANKA protein transport protein SEC31, putative (SEC31) protein length=1388
PBANKA_031600	5	99152.9	5	9	0.040	Plasmodium berghei ANKA replication factor C subunit 1, putative protein length=861
PBANKA_040760	5	66318.9	5	6	0.095	Plasmodium berghei ANKA asparagine synthetase, putative protein length=581
PBANKA_050110	5	16759.0	5	8	0.156	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein,small exported protein (SEP3) protein length=154
PBANKA_050360	5	11787.1	5	20	0.444	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L30e, putative protein length=108
PBANKA_052280	5	19994.8	5	11	0.244	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S19, putative (RPS19) protein length=172
PBANKA_060270	5	40275.8	5	12	0.197	Plasmodium berghei ANKA nucleosome assembly protein, putative (NAPL) protein length=345
PBANKA_082300	5	161341.7	5	8	0.044	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-like protein, putative protein length=1384
PBANKA_083300	5	19236.1	5	28	0.379	Plasmodium berghei ANKA profilin, putative (PFN) protein length=174
PBANKA_090500	5	9166.6	5	13	0.537	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S21, putative (RPS21) protein length=82
PBANKA_091910	5	44649.8	5	8	0.191	Plasmodium berghei ANKA parasitophorous vacuolar protein 1, putative (PV1) protein length=388
PBANKA_092130	5	19697.1	5	29	0.531	Plasmodium berghei ANKA deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, putative protein length=175
PBANKA_093110	5	24745.5	5	11	0.269	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=219
PBANKA_094150	5	29807.4	5	8	0.176	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S4, putative protein length=261
PBANKA_100880	5	68014.1	5	6	0.084	Plasmodium berghei ANKA glucose-6-phosphate isomerase, putative protein length=586
PBANKA_110220	5	46689.2	5	10	0.181	Plasmodium berghei ANKA merozoite surface protein 8 (MSP8) protein length=409
PBANKA_112620	5	20675.9	5	10	0.185	Plasmodium berghei ANKA protein DJ-1, putative (DJ1) protein length=189
PBANKA_113570	5	57133.8	5	16	0.221	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=511
PBANKA_113780	5	291206.2	5	6	0.010	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=2605
PBANKA_114280	5	72969.3	5	15	0.126	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=634

PBANKA_121080	5	26490.3	5	13	0.117	Plasmodium berghei ANKA hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative (HGPR1) protein length=231
PBANKA_121850	5	16636.2	5	18	0.215	Plasmodium berghei ANKA protein phosphatase inhibitor 2, putative protein length=144
PBANKA_122800	5	25359.9	5	8	0.168	Plasmodium berghei ANKA 1-cys peroxiredoxin, putative protein length=220
PBANKA_123560	5	53623.2	5	7	0.081	Plasmodium berghei ANKA adenosylhomocysteinase, putative (SAHH) protein length=479
PBANKA_124230	5	47637.9	5	20	0.109	Plasmodium berghei ANKA Hsc70-interacting protein,58 kDa phosphoprotein (HIP) protein length=423
PBANKA_131740	5	28079.7	5	5	0.082	Plasmodium berghei ANKA co-chaperone p23, putative protein length=255
PBANKA_135860	5	53688.7	5	10	0.075	Plasmodium berghei ANKA isocitrate dehydrogenase (NADP), mitochondrial precursor, putative (IDH) protein length=469
PBANKA_136290	5	67091.5	5	10	0.038	Plasmodium berghei ANKA lysine--tRNA ligase, putative (KRS1) protein length=578
PBANKA_142350	5	25385.0	5	12	0.214	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L13-2, putative protein length=215
PBANKA_143080	5	24693.7	5	17	0.391	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin peroxidase 2, putative (Trx-Px2) protein length=215
PBANKA_143800	5	49622.8	5	18	0.110	Plasmodium berghei ANKA CAMP-dependent protein kinase regulatory subunit, putative (PKAr) protein length=436
PBANKA_010330	4	234947.2	4	5	0.023	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=2033
PBANKA_010740	4	46275.8	4	7	0.099	Plasmodium berghei ANKA ornithine aminotransferase, putative (OAT) protein length=414
PBANKA_010910	4	75446.0	4	5	0.054	Plasmodium berghei ANKA transketolase, putative (TK) protein length=670
PBANKA_030680	4	52978.9	4	5	0.137	Plasmodium berghei ANKA ATP-dependent RNA helicase UAP56, putative (UAP56) protein length=466
PBANKA_031090	4	60751.7	4	4	0.030	Plasmodium berghei ANKA T-complex protein 1, putative protein length=543
PBANKA_040480	4	71075.5	4	9	0.065	Plasmodium berghei ANKA FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, putative protein length=627
PBANKA_040770	4	11778.8	4	9	0.523	Plasmodium berghei ANKA 60S acidic ribosomal protein P2, putative protein length=111
PBANKA_041460	4	14900.1	4	4	0.215	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S15A, putative protein length=130
PBANKA_041610	4	684398.2	4	5	0.009	Plasmodium berghei ANKA dynein heavy chain, putative protein length=5834
PBANKA_051990	4	180209.2	4	4	0.043	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1591
PBANKA_052420	4	16719.9	4	7	0.155	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein,small exported protein (SEP2) protein length=155
PBANKA_061090	4	48368.5	4	7	0.146	Plasmodium berghei ANKA HSP40, subfamily A, putative protein length=424
PBANKA_061520	4	60533.3	4	4	0.063	Plasmodium berghei ANKA calcium-dependent protein kinase 4 (CDPK4) protein length=528
PBANKA_061990	4	45274.4	4	4	0.069	Plasmodium berghei ANKA GTP-binding protein, putative protein length=393
PBANKA_081130	4	134587.0	4	4	0.009	Plasmodium berghei ANKA Ran-binding protein, putative protein length=1160
PBANKA_090640	4	16455.0	4	6	0.189	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L35ae, putative protein length=143
PBANKA_092990	4	92140.7	4	4	0.045	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 90, putative protein length=802
PBANKA_093720.1	3	144166.2	4	10	0.015	Plasmodium berghei ANKA asparagine-rich antigen, putative protein length=1242

PBANKA_093850	4	35487.3	4	10	0.137	Plasmodium berghei ANKA succinyl-CoA synthetase alpha subunit, putative protein length=329
PBANKA_101320	4	51484.5	4	11	0.094	Plasmodium berghei ANKA ATP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit, putative protein length=458
PBANKA_102230	4	47030.7	4	19	0.116	Plasmodium berghei ANKA mannose-1-phosphate guanyltransferase, putative protein length=414
PBANKA_103880	4	24598.7	4	9	0.052	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=210
PBANKA_110420	4	41566.4	4	4	0.194	Plasmodium berghei ANKA 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial, putative (BCKDHB) protein length=372
PBANKA_111750	4	16808.1	4	5	0.189	Plasmodium berghei ANKA ribosomal protein L27a, putative protein length=148
PBANKA_112070	4	20789.3	4	16	0.157	Plasmodium berghei ANKA nascent polypeptide associated complex alpha chain, putative protein length=185
PBANKA_113790	4	30637.6	4	16	0.215	Plasmodium berghei ANKA proliferating cell nuclear antigen, putative (PCNA) protein length=274
PBANKA_114580	4	20338.1	4	9	0.251	Plasmodium berghei ANKA conserved rodent malaria protein, unknown function protein length=179
PBANKA_120500	4	27807.9	4	8	0.185	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=233
PBANKA_120610	4	62149.9	4	7	0.116	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7, putative protein length=537
PBANKA_121090	4	68099.0	4	7	0.084	Plasmodium berghei ANKA phosphoglucomutase, putative protein length=593
PBANKA_121560	4	29947.3	4	18	0.046	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S3A, putative protein length=262
PBANKA_122120	4	18839.7	4	7	0.152	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L34, putative (RPL34) protein length=164
PBANKA_123880	4	127725.3	4	8	0.060	Plasmodium berghei ANKA karyopherin beta, putative protein length=1126
PBANKA_132500	4	7487.1	4	23	0.627	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S28e, putative protein length=67
PBANKA_132970	4	137982.7	4	7	0.040	Plasmodium berghei ANKA 26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative (RPN2) protein length=1219
PBANKA_133830	4	21614.9	4	8	0.290	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L6, putative protein length=190
PBANKA_133840	4	14023.5	4	13	0.422	Plasmodium berghei ANKA vacuolar ATP synthase subunit g, putative protein length=121
PBANKA_133860	4	20660.5	4	8	0.182	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L23, putative (RPL23) protein length=181
PBANKA_134560	4	53679.0	4	4	0.023	Plasmodium berghei ANKA elongation factor Tu, putative protein length=477
PBANKA_134670	4	14947.0	4	4	0.281	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L23, putative protein length=139
PBANKA_135720	4	106076.6	4	6	0.029	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 110, putative (HSP110) protein length=917
PBANKA_010070	3	36115.2	3	11	0.190	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=321
PBANKA_010080	3	157332.9	3	7	0.016	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1382
PBANKA_010390	3	81987.8	3	4	0.029	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=735
PBANKA_010710	3	26410.5	3	5	0.089	Plasmodium berghei ANKA proteasome subunit alpha type-2, putative protein length=235
PBANKA_021550	1	45147.6	3	6	0.031	Plasmodium berghei ANKA erythrocyte membrane associated protein 2 (EMAP2) protein length=387
PBANKA_030860	3	66393.6	3	5	0.064	Plasmodium berghei ANKA asparagine--tRNA ligase, putative protein length=575
PBANKA_031380	3	61305.4	3	5	0.055	Plasmodium berghei ANKA ATP synthase F1, alpha subunit, putative protein length=548

PBANKA_040180	3	126401.7	3	3	0.037	Plasmodium berghei ANKA HAD superfamily protein, putative protein length=1093
PBANKA_040230	3	50061.9	3	5	0.029	Plasmodium berghei ANKA lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, putative (BCKDH-E2) protein length=443
PBANKA_040530	3	16087.9	3	5	0.248	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S23, putative protein length=145
PBANKA_041600	3	104988.7	3	3	0.021	Plasmodium berghei ANKA high molecular weight ropptry protein 3, putative (RhopH3) protein length=908
PBANKA_041820	3	23684.9	3	11	0.121	Plasmodium berghei ANKA ras-related protein RAB7, putative (RAB7) protein length=206
PBANKA_060160	3	201781.0	3	4	0.009	Plasmodium berghei ANKA conserved protein, unknown function protein length=1738
PBANKA_060190	3	12379.5	3	12	0.238	Plasmodium berghei ANKA high mobility group protein B1, putative (HMGB1) protein length=105
PBANKA_060760	3	12067.3	3	15	0.324	Plasmodium berghei ANKA U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM7, putative (LSM7) protein length=108
PBANKA_061020	3	85475.5	3	3	0.041	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM5, putative (MCM5) protein length=758
PBANKA_061040	3	165465.4	3	3	0.016	Plasmodium berghei ANKA ATPase, putative protein length=1472
PBANKA_071910	3	33470.0	3	4	0.203	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=281
PBANKA_081050	3	15508.3	3	4	0.130	Plasmodium berghei ANKA apoptosis-related protein, putative (ARP) protein length=131
PBANKA_081300	3	39931.8	3	5	0.124	Plasmodium berghei ANKA inhibitor of cysteine proteases (ICP) protein length=354
PBANKA_081640	3	146654.8	3	4	0.040	Plasmodium berghei ANKA 6-phosphofructokinase, putative (PFK9) protein length=1299
PBANKA_083000	3	32349.5	3	5	0.097	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=279
PBANKA_090270	3	35928.2	3	3	0.095	Plasmodium berghei ANKA leucine-rich repeat protein (LRR10) protein length=304
PBANKA_090650	3	14555.0	3	7	0.198	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L28, putative protein length=126
PBANKA_090880	3	36997.4	3	8	0.070	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=315
PBANKA_091020	3	89049.9	3	3	0.058	Plasmodium berghei ANKA protein phosphatase 2C, putative protein length=787
PBANKA_091230	3	117761.9	3	4	0.048	Plasmodium berghei ANKA tudor staphylococcal nuclease, putative (TSN) protein length=1013
PBANKA_092000	3	15597.6	3	3	0.243	Plasmodium berghei ANKA multiprotein bridging factor type 1, putative protein length=136
PBANKA_092080	3	35198.9	3	4	0.100	Plasmodium berghei ANKA CRAL/TRIO domain-containing protein, putative protein length=299
PBANKA_092210	3	17852.7	3	5	0.173	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S18, putative protein length=156
PBANKA_092540	3	604152.0	3	3	0.002	Plasmodium berghei ANKA dynein heavy chain, putative protein length=5176
PBANKA_092670	3	17914.5	3	13	0.223	Plasmodium berghei ANKA exported protein 1, putative, circumsporozoite-related antigen (EXP1) protein length=166
PBANKA_093130	3	78627.4	3	10	0.073	Plasmodium berghei ANKA dipeptidyl aminopeptidase 1, putative (DPAP1) protein length=681
PBANKA_094250	3	49016.5	3	6	0.043	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=420
PBANKA_100230	3	471911.6	3	3	0.003	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=3974
PBANKA_100850	3	101867.1	3	3	0.039	Plasmodium berghei ANKA translocon component PTEX150 (PTEX150) protein length=919

PBANKA_101940	3	33244.8	3	6	0.078	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L7-3, putative protein length=284
PBANKA_102200	3	11770.6	3	9	0.267	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S25, putative protein length=105
PBANKA_102840	3	25212.2	3	3	0.142	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L10, putative protein length=219
PBANKA_103210	3	70624.1	3	4	0.084	Plasmodium berghei ANKA rhoptry-associated protein 1, putative (RAP1) protein length=604
PBANKA_103230	3	85799.8	3	5	0.036	Plasmodium berghei ANKA cytidine triphosphate synthetase, putative protein length=756
PBANKA_103800	3	12998.6	3	4	0.259	Plasmodium berghei ANKA cytochrome c, putative protein length=116
PBANKA_110290	3	101475.1	3	6	0.037	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=869
PBANKA_110310	3	13937.0	3	6	0.180	Plasmodium berghei ANKA actin-depolymerizing factor 1 (ADF1) protein length=122
PBANKA_111540	3	9689.2	3	9	0.417	Plasmodium berghei ANKA BolA-like protein, putative protein length=84
PBANKA_112290	3	55405.6	3	7	0.113	Plasmodium berghei ANKA hexokinase, putative (HK) protein length=494
PBANKA_112430	3	43531.9	3	3	0.043	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=372
PBANKA_113410	3	57883.4	3	7	0.047	Plasmodium berghei ANKA TCP-1/cpn60 chaperonin, putative protein length=529
PBANKA_113700	3	133431.5	3	5	0.022	Plasmodium berghei ANKA bergheilysin (BLN) protein length=1149
PBANKA_114240	3	17094.9	3	3	0.262	Plasmodium berghei ANKA nucleoside diphosphate kinase b, putative protein length=149
PBANKA_114480	3	42374.0	3	8	0.141	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=361
PBANKA_114590	3	31722.2	3	6	0.119	Plasmodium berghei ANKA conserved rodent malaria protein, unknown function protein length=278
PBANKA_120080	3	30158.9	3	8	0.076	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=249
PBANKA_120220	3	138038.1	3	4	0.018	Plasmodium berghei ANKA U5 small nuclear ribonuclear protein, putative protein length=1193
PBANKA_120660	3	49660.3	3	3	0.101	Plasmodium berghei ANKA 26S protease regulatory subunit 4, putative protein length=447
PBANKA_121820	3	59128.2	3	7	0.049	Plasmodium berghei ANKA T-complex protein 1 epsilon subunit, putative protein length=535
PBANKA_123180	3	18184.7	3	8	0.170	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L12, putative protein length=165
PBANKA_123220	3	127467.2	3	7	0.035	Plasmodium berghei ANKA FACT complex subunit SPT16 (FACT-L) protein length=1096
PBANKA_123780	3	160818.7	3	5	0.017	Plasmodium berghei ANKA multidrug resistance protein, putative (MDR1) protein length=1419
PBANKA_130990	3	72029.8	3	5	0.027	Plasmodium berghei ANKA M17 leucyl aminopeptidase, putative protein length=635
PBANKA_131040	3	19338.5	3	8	0.316	Plasmodium berghei ANKA centrin-2, putative (CEN2) protein length=168
PBANKA_131270	3	28760.4	3	8	0.080	Plasmodium berghei ANKA gamete egress and sporozoite traversal protein (GEST) protein length=249
PBANKA_131810	3	89819.7	3	4	0.070	Plasmodium berghei ANKA aminopeptidase P, putative (APP) protein length=776
PBANKA_131840	3	53305.2	3	3	0.030	Plasmodium berghei ANKA 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, putative protein length=472
PBANKA_132010	3	93268.5	3	4	0.075	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function (UIS25) protein length=789
PBANKA_134580	3	55898.3	3	3	0.020	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=499

PBANKA_135920	3	23532.0	3	4	0.178	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 2, putative (ALBA2) protein length=202
PBANKA_135970	3	48879.1	3	8	0.037	Plasmodium berghei ANKA 6-cysteine protein (P47) protein length=431
PBANKA_136550	3	37365.3	3	16	0.083	Plasmodium berghei ANKA intra-erythrocytic P. berghei-induced structures protein 1 (IBIS1) protein length=327
PBANKA_140490	3	44674.5	3	6	0.109	Plasmodium berghei ANKA 26S protease regulatory subunit 10B, putative (RPT4) protein length=393
PBANKA_141130	3	117937.0	3	3	0.043	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, putative (EIF4G) protein length=1013
PBANKA_141630	3	16847.3	3	16	0.283	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S19, putative (RPS19) protein length=145
PBANKA_142270	3	22536.2	3	7	0.293	Plasmodium berghei ANKA superoxide dismutase [Fe], putative (FeSOD) protein length=198
PBANKA_144690	3	57729.4	3	5	0.021	Plasmodium berghei ANKA dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial (LPD1) protein length=516
PBANKA_145610	3	16049.7	3	13	0.190	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S17, putative protein length=137
PBANKA_145690	3	12813.7	3	5	0.391	Plasmodium berghei ANKA translation initiation factor SUI1, putative protein length=115
PBANKA_020270	2	168693.5	2	3	0.023	Plasmodium berghei ANKA kinesin-8, putative protein length=1460
PBANKA_020630	2	19572.8	2	2	0.202	Plasmodium berghei ANKA centrin-1, putative (CEN1) protein length=168
PBANKA_030360	2	110614.3	2	2	0.017	Plasmodium berghei ANKA 26S proteasome regulatory subunit RPN1, putative (RPN1) protein length=993
PBANKA_030780	2	32091.5	2	2	0.060	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=282
PBANKA_031680	0	45147.6	2	5	0.031	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=387
PBANKA_040110	2	153538.2	2	4	0.006	Plasmodium berghei ANKA serine/threonine protein kinase, putative (SRPK1) protein length=1306
PBANKA_040190	2	17727.4	2	9	0.178	Plasmodium berghei ANKA DNA-directed RNA polymerase subunit I, putative protein length=152
PBANKA_040420	2	15584.7	2	2	0.158	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative protein length=139
PBANKA_040620	2	430381.7	2	3	0.004	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=3610
PBANKA_040650	2	59569.9	2	3	0.048	Plasmodium berghei ANKA TCP-1/cpn60 chaperonin, putative protein length=539
PBANKA_041750	2	15495.6	2	2	0.221	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L32, putative (RPL32) protein length=131
PBANKA_050320	2	246699.5	2	3	0.010	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor subunit eIF2A, putative protein length=2110
PBANKA_050510	2	20830.8	2	2	0.105	Plasmodium berghei ANKA ADP-ribosylation factor, putative (ARF1) protein length=181
PBANKA_050690	2	50258.7	2	2	0.079	Plasmodium berghei ANKA phospholipid scramblase, putative protein length=431
PBANKA_051270	2	16985.7	2	2	0.146	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=151
PBANKA_051360	2	41944.6	2	9	0.074	Plasmodium berghei ANKA adenosine deaminase, putative (ADA) protein length=363
PBANKA_051720	2	33509.2	2	9	0.068	Plasmodium berghei ANKA haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative (HAD1) protein length=296
PBANKA_051870	2	104617.0	2	4	0.020	Plasmodium berghei ANKA methionine--tRNA ligase, putative protein length=898
PBANKA_060420	2	133016.3	2	2	0.028	Plasmodium berghei ANKA zinc finger protein, putative protein length=1165
PBANKA_061400	2	55657.5	2	2	0.052	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=478

PBANKA_061790	2	74551.6	2	3	0.061	Plasmodium berghei ANKA ferredoxin reductase-like protein, putative protein length=655
PBANKA_061910	2	21711.4	2	5	0.119	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S5, putative protein length=194
PBANKA_071740	2	25217.8	2	2	0.123	Plasmodium berghei ANKA coatomer subunit zeta, putative protein length=219
PBANKA_080320	2	295481.9	2	2	0.006	Plasmodium berghei ANKA inositol-phosphate phosphatase, putative protein length=2511
PBANKA_081060	2	151727.2	2	2	0.005	Plasmodium berghei ANKA exoribonuclease, putative protein length=1293
PBANKA_081190	2	49327.8	2	3	0.028	Plasmodium berghei ANKA cytosolic Fe-S cluster assembly factor NBP35, putative (NBP35) protein length=434
PBANKA_082470	2	71336.9	2	3	0.064	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin reductase, putative (TRXR) protein length=642
PBANKA_083020	2	159903.9	2	2	0.021	Plasmodium berghei ANKA high molecular weight rophtry protein 2, putative (RhopH2) protein length=1354
PBANKA_091750	1	153390.3	2	3	0.011	Plasmodium berghei ANKA structural maintenance of chromosome protein, putative protein length=1289
PBANKA_093120	2	103119.1	2	2	0.023	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 101 (HSP101) protein length=907
PBANKA_093390	2	41780.4	2	5	0.153	Plasmodium berghei ANKA glyoxalase I, putative protein length=353
PBANKA_094360	2	12871.5	2	12	0.135	Plasmodium berghei ANKA 60S acidic ribosomal protein P1, putative protein length=119
PBANKA_100910	2	93964.1	2	4	0.022	Plasmodium berghei ANKA ataxin-2 like protein, putative protein length=818
PBANKA_101000	2	28870.9	2	20	0.044	Plasmodium berghei ANKA mitochondrial acidic protein MAM33, putative protein length=252
PBANKA_101280	2	33259.9	2	7	0.121	Plasmodium berghei ANKA voltage-dependent anion-selective channel protein, putative protein length=289
PBANKA_101860	2	18683.1	2	4	0.106	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L21, putative (RPL21) protein length=161
PBANKA_101970	2	136787.1	2	2	0.015	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1176
PBANKA_102490	2	111278.7	2	6	0.041	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM2, putative (MCM2) protein length=971
PBANKA_102620	2	52927.9	2	5	0.068	Plasmodium berghei ANKA NADP-specific glutamate dehydrogenase, putative (GDH1) protein length=470
PBANKA_110540	2	10817.3	2	6	0.121	Plasmodium berghei ANKA small ubiquitin-related modifier, putative (SUMO) protein length=99
PBANKA_110720	2	74962.5	2	2	0.056	Plasmodium berghei ANKA cell differentiation protein, putative (CAF40) protein length=677
PBANKA_111680	2	53288.9	2	4	0.047	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=448
PBANKA_111740	2	23879.0	2	2	0.226	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=204
PBANKA_112280	2	33245.1	2	2	0.049	Plasmodium berghei ANKA ribonuclease H2 subunit A, putative protein length=288
PBANKA_113050	2	27145.2	2	7	0.137	Plasmodium berghei ANKA proteasome subunit alpha type-7, putative protein length=241
PBANKA_113510	2	17228.6	2	4	0.185	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S15, putative (RPS15) protein length=151
PBANKA_113720	2	106346.6	2	2	0.034	Plasmodium berghei ANKA protein transport protein Sec24A, putative (SEC24A) protein length=942
PBANKA_120190	2	13486.2	2	7	0.136	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S20e, putative protein length=118
PBANKA_121020	2	111115.8	2	2	0.016	Plasmodium berghei ANKA PRE-binding protein, putative (PREBP) protein length=970
PBANKA_121360	2	78310.1	2	2	0.023	Plasmodium berghei ANKA cysteine--tRNA ligase, putative (CysRS) protein length=668

PBANKA_121760	0	16465.4	2	22	0.146	Plasmodium berghei ANKA histone H2A variant, putative (H2A.Z) protein length=158
PBANKA_123420	2	15244.7	2	2	0.068	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S24, putative (RPS24) protein length=133
PBANKA_123480	2	22114.2	2	3	0.159	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S9, putative protein length=189
PBANKA_124390	2	176304.0	2	2	0.010	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1522
PBANKA_130140	2	28858.4	2	2	0.134	Plasmodium berghei ANKA proteasome subunit alpha type-1, putative protein length=253
PBANKA_130510	2	24785.8	2	2	0.124	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L10a, putative protein length=217
PBANKA_131750	2	109618.9	2	2	0.013	Plasmodium berghei ANKA glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase (G6PD-6PGL) protein length=950
PBANKA_132530	2	77547.0	2	4	0.031	Plasmodium berghei ANKA splicing factor 3B subunit 2, putative (SF3B2) protein length=671
PBANKA_132690	2	63597.6	2	5	0.019	Plasmodium berghei ANKA DNA polymerase alpha subunit, putative protein length=541
PBANKA_132810	2	44527.4	2	3	0.042	Plasmodium berghei ANKA ATP synthase (C/AC39) subunit, putative protein length=382
PBANKA_134030	2	48167.0	2	2	0.042	Plasmodium berghei ANKA phosphoribosylpyrophosphate synthetase, putative protein length=430
PBANKA_134430	2	58820.6	2	3	0.039	Plasmodium berghei ANKA chromatin assembly factor 1 subunit, putative protein length=513
PBANKA_134910	2	37664.1	2	2	0.048	Plasmodium berghei ANKA merozoite surface protein 7 (MSP7) protein length=335
PBANKA_135630	2	110869.0	2	4	0.024	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=955
PBANKA_135890	2	85165.0	2	2	0.019	Plasmodium berghei ANKA dynactin subunit 2, putative protein length=728
PBANKA_140130	2	22449.6	2	12	0.129	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S7, putative protein length=194
PBANKA_140680	2	9176.6	2	4	0.171	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S27, putative (RPS27) protein length=82
PBANKA_140760	2	18920.4	2	3	0.086	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L24, putative protein length=163
PBANKA_142060	2	13722.5	2	9	0.179	Plasmodium berghei ANKA histone H2B variant, putative (H2B.Z) protein length=123
PBANKA_142420	2	77278.8	2	7	0.021	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=661
PBANKA_143470	2	229999.6	2	3	0.011	Plasmodium berghei ANKA clathrin heavy chain, putative protein length=1986
PBANKA_144110	2	32735.1	2	8	0.052	Plasmodium berghei ANKA haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative (HAD2) protein length=288
PBANKA_145330	2	86929.9	2	3	0.024	Plasmodium berghei ANKA acyl-CoA synthetase, putative protein length=754
PBANKA_145480	2	212593.3	2	2	0.012	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=1854
PBANKA_145510	2	37629.5	2	4	0.060	Plasmodium berghei ANKA replication factor C subunit 4, putative protein length=336
PBANKA_145830	2	117090.9	2	2	0.026	Plasmodium berghei ANKA kinesin-13, putative protein length=1025
PBANKA_000220	0	119648.9	1	2	0.018	Plasmodium berghei ANKA reticulocyte binding protein, putative (Pb235) protein length=1025
PBANKA_010100	1	30700.2	1	1	0.053	Plasmodium berghei ANKA MYND finger protein, putative protein length=262
PBANKA_020134	1	12965.4	1	7	0.110	Plasmodium berghei ANKA fam-c protein protein length=109
PBANKA_020500	1	19873.8	1	1	0.116	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=172

PBANKA_020930	1	42993.9	1	3	0.055	Plasmodium berghei ANKA actin-related protein (ARP1) protein length=384
PBANKA_030060	1	72409.4	1	1	0.035	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=650
PBANKA_030280	1	57058.8	1	1	0.030	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=495
PBANKA_030650	1	55048.9	1	1	0.020	Plasmodium berghei ANKA conserved protein, unknown function protein length=454
PBANKA_040840	1	126079.8	1	1	0.012	Plasmodium berghei ANKA phosphoglycerate mutase, putative protein length=1069
PBANKA_041040	1	49688.1	1	2	0.056	Plasmodium berghei ANKA glycogen synthase kinase 3 (GSK3) protein length=430
PBANKA_041060	1	14763.4	1	1	0.110	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L26, putative protein length=127
PBANKA_041410	1	43425.4	1	1	0.074	Plasmodium berghei ANKA inorganic pyrophosphatase, putative protein length=367
PBANKA_050130	1	126455.3	1	7	0.016	Plasmodium berghei ANKA DNA polymerase delta catalytic subunit, putative protein length=1097
PBANKA_050170	1	28275.3	1	1	0.057	Plasmodium berghei ANKA phosphomannomutase, putative protein length=245
PBANKA_050430	1	11559.1	1	6	0.178	Plasmodium berghei ANKA flagellar outer arm dynein-associated protein, putative protein length=101
PBANKA_051020	1	36734.5	1	1	0.026	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=310
PBANKA_051400	1	14892.4	1	1	0.168	Plasmodium berghei ANKA transcription elongation factor SPT4, putative (SPT4) protein length=131
PBANKA_051700	1	32820.7	1	5	0.099	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein (ETRAMP10.2) protein length=313
PBANKA_052480	1	12208.7	1	1	0.139	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein,small exported protein (SEP1) protein length=115
PBANKA_061320	1	198795.0	1	1	0.014	Plasmodium berghei ANKA DNA polymerase alpha, putative protein length=1709
PBANKA_061720	1	16598.8	1	2	0.139	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S10, putative protein length=137
PBANKA_061860	1	27530.6	1	1	0.098	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=235
PBANKA_062080	1	63674.0	1	1	0.029	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=559
PBANKA_062330	1	41866.7	1	2	0.061	Plasmodium berghei ANKA tryptophan-rich antigen, putative protein length=342
PBANKA_070940	1	13232.0	1	1	0.112	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=116
PBANKA_071090	1	10482.4	1	2	0.198	Plasmodium berghei ANKA U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM3, putative (LSM3) protein length=91
PBANKA_071520	1	31517.1	1	4	0.071	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor, putative protein length=269
PBANKA_080150	1	88645.7	1	1	0.031	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=745
PBANKA_080760	1	18689.9	1	1	0.087	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S11, putative (RPS11) protein length=161
PBANKA_080820	1	28692.5	1	1	0.036	Plasmodium berghei ANKA proteasome subunit alpha type-3, putative protein length=250
PBANKA_081610	1	18156.3	1	2	0.226	Plasmodium berghei ANKA SUMO-conjugating enzyme UBC9, putative (UBC9) protein length=159
PBANKA_081670	1	22342.9	1	1	0.142	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=190
PBANKA_081900	1	44260.6	1	1	0.035	Plasmodium berghei ANKA secreted acid phosphatase, putative,glideosome-associated protein 50, putative (GAP50) protein length=395
PBANKA_082800	1	142083.8	1	1	0.011	Plasmodium berghei ANKA zinc finger protein, putative protein length=1233

PBANKA_090080	0	325970.2	1	2	0.007	Plasmodium berghei ANKA reticulocyte binding protein, putative (Pb235) protein length=2772
PBANKA_090540	1	27863.0	1	1	0.059	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=238
PBANKA_090560	1	17816.8	1	1	0.103	Plasmodium berghei ANKA translation initiation factor eIF-1A, putative protein length=155
PBANKA_091760	0	115942.0	1	1	0.014	Plasmodium berghei ANKA structural maintenance of chromosome protein, putative, fragment protein length=986
PBANKA_092340	1	14817.8	1	1	0.073	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L35, putative protein length=124
PBANKA_092360	1	32847.4	1	1	0.049	Plasmodium berghei ANKA GrpE protein homolog, mitochondrial, putative (MGE1) protein length=285
PBANKA_092440	1	15371.1	1	3	0.135	Plasmodium berghei ANKA splicing factor, putative protein length=141
PBANKA_092480	1	135471.8	1	1	0.020	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1192
PBANKA_093610	1	15129.9	1	1	0.147	Plasmodium berghei ANKA acylphosphatase, putative protein length=129
PBANKA_093650	1	40473.2	1	1	0.040	Plasmodium berghei ANKA replication factor C subunit 5, putative (RFC5) protein length=349
PBANKA_093720.2	0	148412.1	1	7	0.014	Plasmodium berghei ANKA asparagine-rich antigen, putative protein length=1279
PBANKA_093860	0	39928.8	1	1	0.057	Plasmodium berghei ANKA casein kinase 2, alpha subunit (CK2alpha) protein length=335
PBANKA_094280	1	41878.8	1	2	0.071	Plasmodium berghei ANKA syntaxin, putative protein length=351
PBANKA_100060	1	38018.4	1	1	0.047	Plasmodium berghei ANKA erythrocyte membrane antigen 1 protein length=339
PBANKA_101310	1	17895.1	1	1	0.103	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L14, putative protein length=156
PBANKA_101490	1	145511.3	1	2	0.016	Plasmodium berghei ANKA coatamer protein, beta subunit, putative protein length=1256
PBANKA_101630	1	42719.1	1	3	0.027	Plasmodium berghei ANKA proliferation-associated protein 2g4, putative protein length=377
PBANKA_102280	1	94962.8	1	1	0.014	Plasmodium berghei ANKA glycine--tRNA ligase, putative (GlyRS) protein length=812
PBANKA_102340	1	56460.7	1	1	0.020	Plasmodium berghei ANKA glutathione reductase, putative (GR) protein length=497
PBANKA_103370	1	35862.0	1	2	0.101	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=307
PBANKA_103660	1	40441.5	1	1	0.046	Plasmodium berghei ANKA ribonucleotide reductase small subunit, putative protein length=349
PBANKA_110300	1	38099.9	1	4	0.060	Plasmodium berghei ANKA serine/arginine-rich splicing factor 12, putative (SRSF12) protein length=317
PBANKA_111140	1	69610.4	1	2	0.041	Plasmodium berghei ANKA inositol-3-phosphate synthase, putative (INO1) protein length=607
PBANKA_112350	1	292422.5	1	1	0.006	Plasmodium berghei ANKA SNF2 helicase, putative (ISWI) protein length=2523
PBANKA_112530	1	106772.4	1	1	0.016	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=906
PBANKA_112770	1	79447.3	1	5	0.031	Plasmodium berghei ANKA nicotinate phosphoribosyltransferase, putative (NAPRT) protein length=689
PBANKA_113420	1	28292.4	1	4	0.050	Plasmodium berghei ANKA pyrroline-5-carboxylate reductase, putative protein length=260
PBANKA_113500	1	18334.7	1	2	0.065	Plasmodium berghei ANKA HVA22-like protein, putative protein length=153
PBANKA_113550	1	29794.4	1	1	0.064	Plasmodium berghei ANKA high mobility group protein B4, putative (HMGB4) protein length=252
PBANKA_120900	1	25459.3	1	1	0.094	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit, putative protein length=224

PBANKA_121070	1	22853.9	1	1	0.177	Plasmodium berghei ANKA ubiquinol-cytochrome c reductase complex subunit, putative protein length=192
PBANKA_121890	1	17629.9	1	2	0.057	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1 (EF-1), putative protein length=157
PBANKA_122210	1	74190.4	1	2	0.015	Plasmodium berghei ANKA regulator of chromosome condensation, putative protein length=650
PBANKA_122580	1	23866.0	1	2	0.057	Plasmodium berghei ANKA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative (CYP24) protein length=210
PBANKA_122660	1	51558.9	1	3	0.020	Plasmodium berghei ANKA tubulin gamma chain, putative protein length=452
PBANKA_124190	0	17176.0	1	2	0.113	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-conjugating enzyme E2 N, putative (UBC13) protein length=151
PBANKA_130220	1	44468.6	1	1	0.032	Plasmodium berghei ANKA translocation protein sec62, putative protein length=380
PBANKA_130620	1	46126.4	1	5	0.050	Plasmodium berghei ANKA tRNA binding protein, putative protein length=403
PBANKA_131030	1	163877.0	1	3	0.012	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function, fragment protein length=1395
PBANKA_131820	1	18136.3	1	1	0.062	Plasmodium berghei ANKA nifU protein, putative protein length=161
PBANKA_133110	1	10660.2	1	1	0.120	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=92
PBANKA_133690	1	60071.0	1	1	0.037	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=508
PBANKA_133710	1	82473.2	1	1	0.030	Plasmodium berghei ANKA splicing factor 1, putative (SF1) protein length=710
PBANKA_134660	1	100797.0	1	1	0.015	Plasmodium berghei ANKA glutamine--tRNA ligase, putative protein length=852
PBANKA_134890	1	60945.2	1	4	0.028	Plasmodium berghei ANKA chaperone binding protein, putative protein length=509
PBANKA_135060	1	41730.9	1	1	0.048	Plasmodium berghei ANKA nuclear movement protein, putative (NUDC) protein length=355
PBANKA_135190	1	26708.1	1	2	0.121	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L6-2, putative protein length=231
PBANKA_135310	1	193602.8	1	1	0.007	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1637
PBANKA_135880	1	25703.4	1	1	0.060	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=216
PBANKA_136520	1	23599.2	1	3	0.063	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin-related protein, putative protein length=206
PBANKA_140060	1	152048.9	1	2	0.020	Plasmodium berghei ANKA cytoadherence linked asexual protein, putative protein length=1296
PBANKA_141560	1	107417.0	1	2	0.012	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM4, putative (MCM4) protein length=944
PBANKA_142180	1	8320.3	1	1	0.186	Plasmodium berghei ANKA mitochondrial ATP synthase F1, epsilon subunit, putative protein length=70
PBANKA_142700	1	34622.8	1	1	0.095	Plasmodium berghei ANKA protein phosphatase, putative protein length=305
PBANKA_142750	1	10275.1	1	7	0.182	Plasmodium berghei ANKA acyl-CoA binding protein, putative protein length=88
PBANKA_144140	1	30280.0	1	1	0.072	Plasmodium berghei ANKA proliferating cell nuclear antigen 2, putative (PCNA2) protein length=264
PBANKA_144510	1	22856.8	1	3	0.077	Plasmodium berghei ANKA ATP-dependent protease subunit ClpQ, putative (ClpQ) protein length=207
PBANKA_145530	1	47687.3	1	1	0.047	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=408
PBANKA_145630	1	10633.3	1	1	0.140	Plasmodium berghei ANKA mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM13, putative (TIM13) protein length=93
PBANKA_146180	1	47958.7	1	1	0.045	Plasmodium berghei ANKA 26S protease regulatory subunit 8, putative (RPT6) protein length=422

Suppl. Table S2. *P. berghei* phosphopeptides and assigned phosphorylated proteins identified during gametogenesis. The lengths are indicated by number of amino acid residues.

Accession number	#Unique Peptides	MW	Sequence Count	Spectrum Count	Coverage	Description
PBANKA_071190	24	75155.0	26	67	0.4531	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70 (HSP70) protein length=693
PBANKA_113340	0	48909.9	17	59	0.4853	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443
PBANKA_113330	0	48909.9	17	59	0.4853	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443
PBANKA_132640	16	36541.0	16	50	0.6766	Plasmodium berghei ANKA glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, putative (GAPDH) protein length=337
PBANKA_120690	16	49739.9	16	42	0.4090	Plasmodium berghei ANKA tubulin beta chain, putative protein length=445
PBANKA_143220	13	24252.8	13	37	0.6308	Plasmodium berghei ANKA male development gene 1 (MDV1) protein length=214
PBANKA_130860	12	39808.9	12	33	0.3848	Plasmodium berghei ANKA fructose-bisphosphate aldolase 2 (ALDO2) protein length=369
PBANKA_071260	13	30166.7	13	30	0.5840	Plasmodium berghei ANKA 14-3-3 protein (14-3-3I) protein length=262
PBANKA_052270	4	49669.3	9	28	0.3311	Plasmodium berghei ANKA alpha tubulin 2 protein length=450
PBANKA_020300	10	50481.8	10	27	0.2399	Plasmodium berghei ANKA chromatin assembly factor 1 protein WD40 domain, putative protein length=446
PBANKA_130130	6	39026.9	6	26	0.3650	Plasmodium berghei ANKA trailer hitch homolog, putative (CITH) protein length=337
PBANKA_142330	11	26845.5	11	25	0.4298	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 1, putative (ALBA1) protein length=242
PBANKA_070280	13	55358.1	13	24	0.2718	Plasmodium berghei ANKA protein disulfide isomerase protein length=482
PBANKA_081890	12	72084.9	12	22	0.2396	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70, putative protein length=651
PBANKA_121430	5	48977.4	6	20	0.2309	Plasmodium berghei ANKA enolase, putative (ENO) protein length=446
PBANKA_101670	8	32689.7	8	19	0.2796	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=279
PBANKA_041770	1	50156.3	6	19	0.2384	Plasmodium berghei ANKA alpha tubulin 1 protein length=453
PBANKA_142690	9	104135.3	9	18	0.1111	Plasmodium berghei ANKA RNA helicase, putative protein length=909
PBANKA_134010	5	34384.1	5	18	0.2278	Plasmodium berghei ANKA L-lactate dehydrogenase (LDH) protein length=316
PBANKA_121470	10	111954.5	10	15	0.2029	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=961
PBANKA_112560	9	55493.8	9	15	0.2544	Plasmodium berghei ANKA pyruvate kinase, putative protein length=511
PBANKA_111860	6	90764.2	6	15	0.1153	Plasmodium berghei ANKA cell division cycle protein 48 homologue, putative protein length=815
PBANKA_020160	2	18642.4	2	15	0.2034	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein (ETRAMP) protein length=177
PBANKA_143920	8	93239.1	8	14	0.1403	Plasmodium berghei ANKA polyadenylate-binding protein, putative (PABP) protein length=834
PBANKA_134040	5	36916.3	5	13	0.1707	Plasmodium berghei ANKA oxidoreductase, putative protein length=334
PBANKA_144900	6	65322.5	6	12	0.0971	Plasmodium berghei ANKA aspartyl protease, putative protein length=577

PBANKA_114170	0	14589.9	5	12	0.4688	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-60S ribosomal protein L40, putative protein length=128
PBANKA_061030	0	25685.8	5	12	0.2620	Plasmodium berghei ANKA polyubiquitin, putative protein length=229
PBANKA_121650	7	18788.3	7	11	0.2118	Plasmodium berghei ANKA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative (CYP19A) protein length=170
PBANKA_113570	3	57133.8	3	11	0.1585	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=511
PBANKA_092810	5	28671.1	5	10	0.2440	Plasmodium berghei ANKA phosphoglycerate mutase, putative (PGM1) protein length=250
PBANKA_082340	5	45448.1	5	10	0.1899	Plasmodium berghei ANKA phosphoglycerate kinase, putative (PGK) protein length=416
PBANKA_030130	3	9784.8	3	10	0.5165	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=91
PBANKA_124440	5	9931.8	5	9	0.2209	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=86
PBANKA_121930	6	94821.3	6	9	0.0646	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 110, putative (HSP110c) protein length=836
PBANKA_114480	2	42374.0	2	9	0.1413	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=361
PBANKA_060430	4	38739.5	4	9	0.1939	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=330
PBANKA_093960	4	368279.4	4	8	0.0064	Plasmodium berghei ANKA polyadenylate-binding protein-interacting protein 1, putative (PAIP1) protein length=3296
PBANKA_061160	4	96972.0	4	8	0.0614	Plasmodium berghei ANKA ribonucleoside-diphosphate reductase, large subunit, putative protein length=847
PBANKA_131480	7	93297.2	7	7	0.1130	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 2, putative protein length=832
PBANKA_093420	3	41217.1	3	7	0.1573	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin domain-containing protein DSK2, putative (DSK2) protein length=375
PBANKA_143105	2	10972.9	2	6	0.2451	Plasmodium berghei ANKA 10 kDa chaperonin, putative (CPN10) protein length=102
PBANKA_136030	3	42121.4	3	6	0.1070	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 4, putative (ALBA4) protein length=374
PBANKA_135510	3	35429.9	3	6	0.1613	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S6, putative protein length=310
PBANKA_121850	3	16636.2	3	6	0.2153	Plasmodium berghei ANKA protein phosphatase inhibitor 2, putative protein length=144
PBANKA_091910	2	44649.8	2	6	0.0515	Plasmodium berghei ANKA parasitophorous vacuolar protein 1, putative (PV1) protein length=388
PBANKA_145930	4	41840.0	4	5	0.1702	Plasmodium berghei ANKA actin I protein length=376
PBANKA_145780	3	33119.2	3	5	0.2027	Plasmodium berghei ANKA ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, putative (ARFGAP) protein length=296
PBANKA_142430	4	32548.1	4	5	0.2077	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=284
PBANKA_130280	2	21622.3	2	5	0.1897	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin peroxidase 1 (TPx1) protein length=195
PBANKA_114280	2	72969.3	2	5	0.0584	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=634
PBANKA_111300	2	26971.7	2	5	0.1393	Plasmodium berghei ANKA purine nucleoside phosphorylase, putative (PNP) protein length=244
PBANKA_101000	1	28870.9	1	5	0.0794	Plasmodium berghei ANKA mitochondrial acidic protein MAM33, putative protein length=252
PBANKA_093770	2	12700.3	2	5	0.3274	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L36, putative (RPL36) protein length=113
PBANKA_083300	3	19236.1	3	5	0.2241	Plasmodium berghei ANKA profilin, putative (PFN) protein length=174

PBANKA_083100	2	198529.4	2	5	0.0201	Plasmodium berghei ANKA merozoite surface protein 1 (MSP1) protein length=1791
PBANKA_081990	4	31650.8	4	5	0.1423	Plasmodium berghei ANKA nucleosome assembly protein (NAPS) protein length=267
PBANKA_070470	5	57214.4	5	5	0.1232	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=487
PBANKA_051700	1	32820.7	1	5	0.0990	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein (ETRAMP10.2) protein length=313
PBANKA_040470	4	12361.4	4	5	0.5138	Plasmodium berghei ANKA glutaredoxin 1, putative (GRX1) protein length=109
PBANKA_143800	1	49622.8	1	4	0.0390	Plasmodium berghei ANKA CAMP-dependent protein kinase regulatory subunit, putative (PKAr) protein length=436
PBANKA_132970	2	137982.7	2	4	0.0345	Plasmodium berghei ANKA 26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative (RPN2) protein length=1219
PBANKA_132500	3	7487.1	3	4	0.5672	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S28e, putative protein length=67
PBANKA_111770	1	34273.8	1	4	0.0479	Plasmodium berghei ANKA malate dehydrogenase, putative (MDH) protein length=313
PBANKA_101940	2	33244.8	2	4	0.0775	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L7-3, putative protein length=284
PBANKA_092130	2	19697.1	2	4	0.2629	Plasmodium berghei ANKA deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, putative protein length=175
PBANKA_081420	2	29995.1	2	4	0.1556	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-beta, putative protein length=257
PBANKA_051280	4	66720.1	4	4	0.0744	Plasmodium berghei ANKA merozoite TRAP-like protein, putative (MTRAP) protein length=618
PBANKA_031100	1	156519.8	1	4	0.0122	Plasmodium berghei ANKA protein transport protein SEC31, putative (SEC31) protein length=1388
PBANKA_030500	3	123889.8	3	4	0.0731	Plasmodium berghei ANKA serine repeat antigen 2 (SERA2) protein length=1122
PBANKA_010330	3	234947.2	3	4	0.0212	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=2033
PBANKA_010080	1	157332.9	1	4	0.0159	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1382
PBANKA_145070	2	45627.5	2	3	0.0856	Plasmodium berghei ANKA clustered-asparagine-rich protein, putative protein length=397
PBANKA_141910	2	47783.5	2	3	0.0662	Plasmodium berghei ANKA dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, putative protein length=423
PBANKA_135630	1	110869.0	1	3	0.0241	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=955
PBANKA_133190	1	45322.5	1	3	0.0402	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic initiation factor 4a, putative (eIF4A) protein length=398
PBANKA_122120	2	18839.7	2	3	0.1524	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L34, putative (RPL34) protein length=164
PBANKA_121760	0	16465.4	1	3	0.0570	Plasmodium berghei ANKA histone H2A variant, putative (H2A.Z) protein length=158
PBANKA_121400	3	62189.5	3	3	0.1192	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 60, putative protein length=579
PBANKA_120610	3	62149.9	3	3	0.1043	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7, putative protein length=537
PBANKA_111700	0	14194.8	1	3	0.0677	Plasmodium berghei ANKA histone H2A, putative (H2A) protein length=133
PBANKA_110670	3	46085.3	3	3	0.0803	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L4, putative (RPL4) protein length=411
PBANKA_110220	1	46689.2	1	3	0.0416	Plasmodium berghei ANKA merozoite surface protein 8 (MSP8) protein length=409
PBANKA_103270	2	58837.1	2	3	0.0907	Plasmodium berghei ANKA RNA binding protein Bruno, putative (HoBo) protein length=507

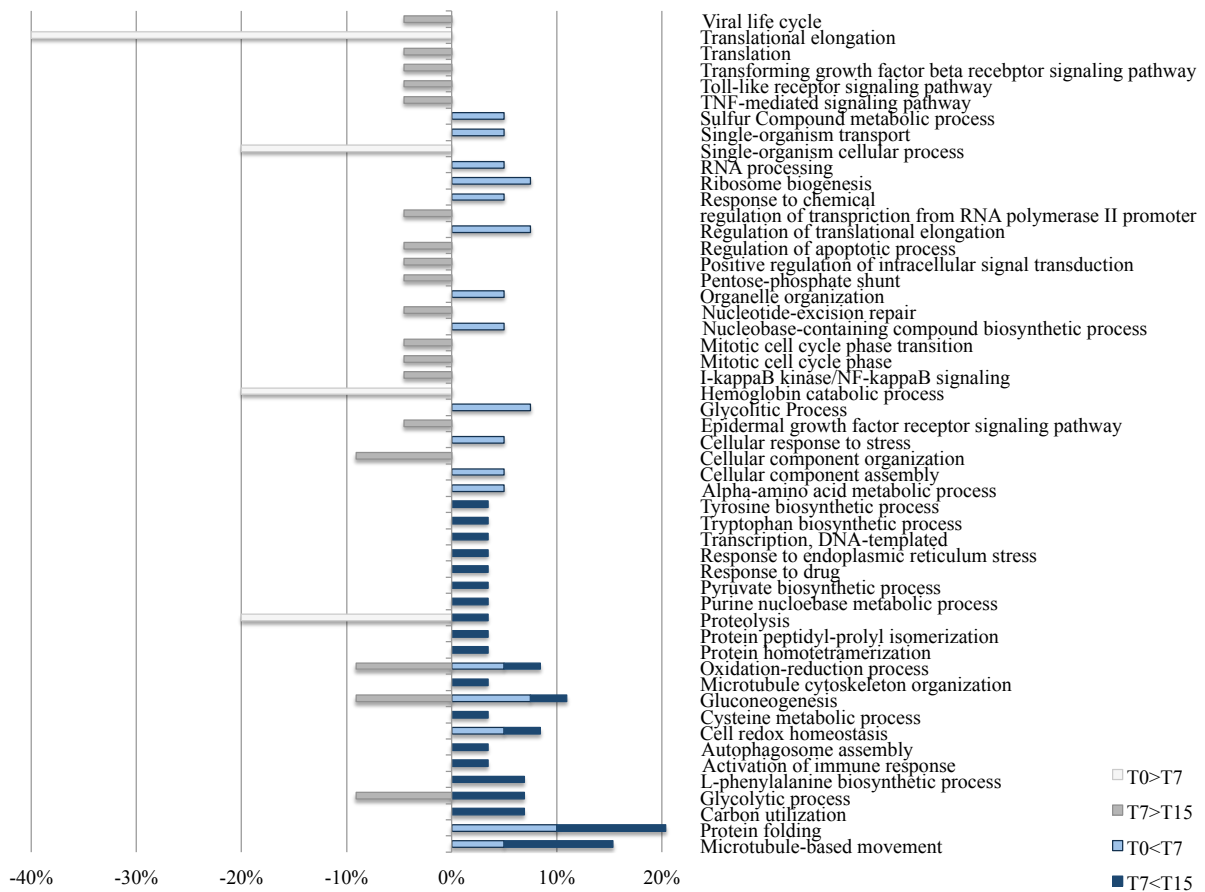
PBANKA_102620	1	52927.9	1	3	0.0404	Plasmodium berghei ANKA NADP-specific glutamate dehydrogenase, putative (GDH1) protein length=470
PBANKA_101950	2	33843.2	2	3	0.1092	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L5, putative protein length=293
PBANKA_101850	2	19905.6	2	3	0.1379	Plasmodium berghei ANKA transcription factor 3b, putative protein length=174
PBANKA_100950	2	336064.3	2	3	0.0125	Plasmodium berghei ANKA NAD(P)H-dependent glutamate synthase, putative protein length=2962
PBANKA_093110	2	24745.5	2	3	0.1142	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=219
PBANKA_093030	0	24852.8	1	3	0.0654	Plasmodium berghei ANKA GTP-binding nuclear protein RAN/TC4, putative protein length=214
PBANKA_091440	3	73103.1	3	3	0.0407	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70, putative (UIS24) protein length=663
PBANKA_090650	1	14555.0	1	3	0.1111	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L28, putative protein length=126
PBANKA_082300	2	161341.7	2	3	0.0210	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-like protein, putative protein length=1384
PBANKA_082170	1	55844.6	1	3	0.0217	Plasmodium berghei ANKA inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, putative protein length=507
PBANKA_061920	3	54662.5	3	3	0.0710	Plasmodium berghei ANKA secreted ookinete protein, putative (PSOP1) protein length=479
PBANKA_051990	3	180209.2	3	3	0.0339	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1591
PBANKA_051190	2	44319.8	2	3	0.0415	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L3, putative (RPL3) protein length=386
PBANKA_040110	1	153538.2	1	3	0.0061	Plasmodium berghei ANKA serine/threonine protein kinase, putative (SRPK1) protein length=1306
PBANKA_030490	2	123106.3	2	3	0.0374	Plasmodium berghei ANKA serine repeat antigen 3 (SERA3) protein length=1096
PBANKA_145020	2	49575.4	2	2	0.0769	Plasmodium berghei ANKA serine hydroxymethyltransferase, putative (SHMT) protein length=442
PBANKA_143730	2	93169.2	2	2	0.0483	Plasmodium berghei ANKA endoplasmin, putative (GRP94) protein length=808
PBANKA_142270	1	22536.2	1	2	0.1061	Plasmodium berghei ANKA superoxide dismutase [Fe], putative (FeSOD) protein length=198
PBANKA_141130	2	117937.0	2	2	0.0434	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, putative (EIF4G) protein length=1013
PBANKA_140760	1	18920.4	1	2	0.0798	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L24, putative protein length=163
PBANKA_135920	2	23532.0	2	2	0.1782	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 2, putative (ALBA2) protein length=202
PBANKA_133840	2	14023.5	2	2	0.2810	Plasmodium berghei ANKA vacuolar ATP synthase subunit g, putative protein length=121
PBANKA_132530	1	77547.0	1	2	0.0313	Plasmodium berghei ANKA splicing factor 3B subunit 2, putative (SF3B2) protein length=671
PBANKA_132090	1	11612.9	1	2	0.1346	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin 1, putative (TRX1) protein length=104
PBANKA_130070	2	183560.8	2	2	0.0198	Plasmodium berghei ANKA LCCL domain-containing protein (CCp1) protein length=1615
PBANKA_124390	1	176304.0	1	2	0.0099	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1522
PBANKA_124230	1	47637.9	1	2	0.0544	Plasmodium berghei ANKA Hsc70-interacting protein, 58 kDa phosphoprotein (HIP) protein length=423
PBANKA_123220	1	127467.2	1	2	0.0201	Plasmodium berghei ANKA FACT complex subunit SPT16 (FACT-L) protein length=1096
PBANKA_123210	2	36233.1	2	2	0.0635	Plasmodium berghei ANKA pre-mRNA-splicing factor, putative (SR1) protein length=315
PBANKA_123100	2	16046.7	2	2	0.1325	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S11, putative protein length=151

PBANKA_122210	1	74190.4	1	2	0.0154	Plasmodium berghei ANKA regulator of chromosome condensation, putative protein length=650
PBANKA_121560	1	29947.3	1	2	0.0420	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S3A, putative protein length=262
PBANKA_113510	2	17228.6	2	2	0.1854	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S15, putative (RPS15) protein length=151
PBANKA_111520	1	132736.1	1	2	0.0185	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1138
PBANKA_111340	2	85042.1	2	2	0.0388	Plasmodium berghei ANKA secreted ookinete protein, putative,6-cysteine protein (PSOP12) protein length=721
PBANKA_111140	1	69610.4	1	2	0.0412	Plasmodium berghei ANKA inositol-3-phosphate synthase, putative (INO1) protein length=607
PBANKA_103440	2	50432.6	2	2	0.1111	Plasmodium berghei ANKA plasmepsin IV (PM4) protein length=450
PBANKA_103390	1	24959.3	1	2	0.0734	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S8e, putative protein length=218
PBANKA_103230	1	85799.8	1	2	0.0172	Plasmodium berghei ANKA cytidine triphosphate synthetase, putative protein length=756
PBANKA_102200	1	11770.6	1	2	0.1429	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S25, putative protein length=105
PBANKA_101050	2	65585.2	2	2	0.0555	Plasmodium berghei ANKA Hsp70/Hsp90 organizing protein, putative (HOP) protein length=559
PBANKA_100850	1	101867.1	1	2	0.0109	Plasmodium berghei ANKA translocon component PTEX150 (PTEX150) protein length=919
PBANKA_094150	2	29807.4	2	2	0.0920	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S4, putative protein length=261
PBANKA_093840	2	39080.3	2	2	0.1023	Plasmodium berghei ANKA endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein, putative protein length=342
PBANKA_093130	1	78627.4	1	2	0.0352	Plasmodium berghei ANKA dipeptidyl aminopeptidase 1, putative (DPAP1) protein length=681
PBANKA_092670	1	17914.5	1	2	0.2048	Plasmodium berghei ANKA exported protein 1, putative,circumsporozoite-related antigen (EXP1) protein length=166
PBANKA_091790	2	50927.3	2	2	0.0754	Plasmodium berghei ANKA 26S protease regulatory subunit 6a, putative (RPT5) protein length=451
PBANKA_090880	2	36997.4	2	2	0.0698	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=315
PBANKA_090690	2	272989.3	2	2	0.0090	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=2336
PBANKA_081640	1	146654.8	1	2	0.0239	Plasmodium berghei ANKA 6-phosphofructokinase, putative (PFK9) protein length=1299
PBANKA_081050	1	15508.3	1	2	0.1298	Plasmodium berghei ANKA apoptosis-related protein, putative (ARP) protein length=131
PBANKA_080570	2	83143.2	2	2	0.0444	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 90, putative (HSP90) protein length=720
PBANKA_061020	2	85475.5	2	2	0.0303	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM5, putative (MCM5) protein length=758
PBANKA_060420	2	133016.3	2	2	0.0275	Plasmodium berghei ANKA zinc finger protein, putative protein length=1165
PBANKA_060320	1	17524.7	1	2	0.0870	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 5A, putative (EIF5A) protein length=161
PBANKA_052420	1	16719.9	1	2	0.1548	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein,small exported protein (SEP2) protein length=155
PBANKA_030510	2	154804.4	2	2	0.0349	Plasmodium berghei ANKA serine repeat antigen 1 (SERA1) protein length=1406
PBANKA_020500	1	19873.8	1	2	0.1163	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=172
PBANKA_020270	1	168693.5	1	2	0.0075	Plasmodium berghei ANKA kinesin-8, putative protein length=1460
PBANKA_020134	1	12965.4	1	2	0.1101	Plasmodium berghei ANKA fam-c protein protein length=109

PBANKA_010070	1	36115.2	1	2	0.1308	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=321
PBANKA_145690	1	12813.7	1	1	0.1391	Plasmodium berghei ANKA translation initiation factor SUI1, putative protein length=115
PBANKA_144110	1	32735.1	1	1	0.0521	Plasmodium berghei ANKA haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative (HAD2) protein length=288
PBANKA_143150	1	42125.5	1	1	0.0390	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=359
PBANKA_143080	1	24693.7	1	1	0.0884	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin peroxidase 2, putative (Trx-Px2) protein length=215
PBANKA_142420	1	77278.8	1	1	0.0287	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=661
PBANKA_142180	1	8320.3	1	1	0.1857	Plasmodium berghei ANKA mitochondrial ATP synthase F1, epsilon subunit, putative protein length=70
PBANKA_141630	1	16847.3	1	1	0.1310	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S19, putative (RPS19) protein length=145
PBANKA_141030	1	123256.3	1	1	0.0141	Plasmodium berghei ANKA M1-family alanyl aminopeptidase, putative protein length=1064
PBANKA_136550	1	37365.3	1	1	0.0428	Plasmodium berghei ANKA intra-erythrocytic P. berghei-induced structures protein 1 (IBIS1) protein length=327
PBANKA_135890	1	85165.0	1	1	0.0192	Plasmodium berghei ANKA dynactin subunit 2, putative protein length=728
PBANKA_135130	1	213504.3	1	1	0.0107	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1864
PBANKA_134580	1	55898.3	1	1	0.0200	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=499
PBANKA_133110	1	10660.2	1	1	0.1196	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=92
PBANKA_133000	1	31903.4	1	1	0.0623	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=273
PBANKA_132440	1	16835.5	1	1	0.0616	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L27, putative (RPL27) protein length=146
PBANKA_132020	1	267298.3	1	1	0.0079	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=2275
PBANKA_132010	1	93268.5	1	1	0.0304	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function (UIS25) protein length=789
PBANKA_131030	1	163877.0	1	1	0.0115	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function, fragment protein length=1395
PBANKA_130380	1	27807.4	1	1	0.0927	Plasmodium berghei ANKA triosephosphate isomerase, putative (TIM) protein length=248
PBANKA_124180	1	107214.3	1	1	0.0159	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM3, putative (MCM3) protein length=945
PBANKA_123450	1	22469.7	1	1	0.0628	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=191
PBANKA_123170	1	27855.1	1	1	0.0538	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L2, putative (RPL2) protein length=260
PBANKA_122900	1	126199.2	1	1	0.0183	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=1095
PBANKA_121020	1	111115.8	1	1	0.0155	Plasmodium berghei ANKA PRE-binding protein, putative (PREBP) protein length=970
PBANKA_120720	1	27364.5	1	1	0.0579	Plasmodium berghei ANKA adenylate kinase, putative (AK1) protein length=242
PBANKA_112350	1	292422.5	1	1	0.0055	Plasmodium berghei ANKA SNF2 helicase, putative (ISWI) protein length=2523
PBANKA_111740	1	23879.0	1	1	0.0539	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=204
PBANKA_110720	1	74962.5	1	1	0.0561	Plasmodium berghei ANKA cell differentiation protein, putative (CAF40) protein length=677
PBANKA_110310	1	13937.0	1	1	0.1803	Plasmodium berghei ANKA actin-depolymerizing factor 1 (ADF1) protein length=122

PBANKA_103660	1	40441.5	1	1	0.0458	Plasmodium berghei ANKA ribonucleotide reductase small subunit, putative protein length=349
PBANKA_103520	1	148090.1	1	1	0.0123	Plasmodium berghei ANKA LCCL domain-containing protein (CCp3) protein length=1304
PBANKA_101970	1	136787.1	1	1	0.0145	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1176
PBANKA_101320	1	51484.5	1	1	0.0284	Plasmodium berghei ANKA ATP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit, putative protein length=458
PBANKA_100610	1	54490.2	1	1	0.0522	Plasmodium berghei ANKA flap endonuclease 1, putative (FEN1) protein length=479
PBANKA_094180	1	13231.2	1	1	0.1271	Plasmodium berghei ANKA histone H2B, putative (H2B) protein length=118
PBANKA_092990	1	92140.7	1	1	0.0224	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 90, putative protein length=802
PBANKA_092540	1	604152.0	1	1	0.0023	Plasmodium berghei ANKA dynein heavy chain, putative protein length=5176
PBANKA_092340	1	14817.8	1	1	0.0726	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L35, putative protein length=124
PBANKA_091230	1	117761.9	1	1	0.0138	Plasmodium berghei ANKA tudor staphylococcal nuclease, putative (TSN) protein length=1013
PBANKA_090500	1	9166.6	1	1	0.1098	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S21, putative (RPS21) protein length=82
PBANKA_082800	1	142083.8	1	1	0.0105	Plasmodium berghei ANKA zinc finger protein, putative protein length=1233
PBANKA_080800	1	157950.9	1	1	0.0060	Plasmodium berghei ANKA cdc2-related protein kinase 4 (CRK4) protein length=1342
PBANKA_080760	1	18689.9	1	1	0.0870	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S11, putative (RPS11) protein length=161
PBANKA_071660	1	29402.7	1	1	0.1725	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=255
PBANKA_071090	1	10482.4	1	1	0.1978	Plasmodium berghei ANKA U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3, putative (LSM3) protein length=91
PBANKA_061720	1	16598.8	1	1	0.1387	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S10, putative protein length=137
PBANKA_061320	1	198795.0	1	1	0.0135	Plasmodium berghei ANKA DNA polymerase alpha, putative protein length=1709
PBANKA_060160	1	201781.0	1	1	0.0092	Plasmodium berghei ANKA conserved protein, unknown function protein length=1738
PBANKA_051020	1	36734.5	1	1	0.0258	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=310
PBANKA_050810	1	304513.5	1	1	0.0086	Plasmodium berghei ANKA chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1, putative (CHD1) protein length=2673
PBANKA_050690	1	50258.7	1	1	0.0510	Plasmodium berghei ANKA phospholipid scramblase, putative protein length=431
PBANKA_050660	1	55599.8	1	1	0.0291	Plasmodium berghei ANKA serine/arginine-rich splicing factor 4, putative (SRSF4) protein length=481
PBANKA_050360	1	11787.1	1	1	0.2037	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L30e, putative protein length=108
PBANKA_050320	1	246699.5	1	1	0.0095	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor subunit eIF2A, putative protein length=2110
PBANKA_050110	1	16759.0	1	1	0.1104	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein,small exported protein (SEP3) protein length=154
PBANKA_041820	1	23684.9	1	1	0.0680	Plasmodium berghei ANKA ras-related protein RAB7, putative (RAB7) protein length=206
PBANKA_040620	1	430381.7	1	1	0.0036	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=3610
PBANKA_040520	1	59033.4	1	1	0.0281	Plasmodium berghei ANKA T-complex protein beta subunit, putative protein length=533
PBANKA_040300	1	12039.7	1	1	0.1359	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L44, putative (RPL44) protein length=103

PBANKA_040180	1	126401.7	1	1	0.0156	Plasmodium berghei ANKA HAD superfamily protein, putative protein length=1093
PBANKA_030280	1	57058.8	1	1	0.0303	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=495



Suppl. Figure 2. Representation of the biological process categories obtained from Blast2GO of all phospho-regulated proteins after pairwise comparison of each gametocyte differentiation step through PatternLab. Proteins that had statistically significant variation in their volume abundance between times were used in this analysis. The variation in percentage by category of proteins from each GO-term between two times: T0<T7, T0>T7, T7<T15 and T7>T15.

A) Multiple alignment of human alpha tubulin 1 (A23035) and *Plasmodium berghei* alpha tubulin 1 and 2 isotypes (PBANKA_041770 and PBANKA_052270).

Amino acids in red correspond to the phosphorylation sites of the human alpha tubulin 1 (HSATub) reported in the literature (Liu N, Xiong Y, Ren Y et al. J. Proteome Res 2015 14: 3292-3304.) and the corresponding phosphorylation sites in *P. berghei* alpha tubulin 1 isotypes (PfATub1 and PfATub2).

Bold and blue amino acids correspond to potential new sites of phosphorylation.

Underlined and colored sequences correspond to phosphopeptides recovered in this study.

```

HSATub      MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGK 60
PfATub1    MREVISIHVGQAGIQVGNACWELFCLEHGIQPDGQMPDQAGRANDDAFNTFFSETGAGK
PfATub2    MREVISIHVGQAGIQIGNACWELFCLEHGIQPDGQMPDQVAVGGDDAFNTFFSETGAGK
***          *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
HSATub      HVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLD120
PfATub1    HVPRCVFVDLEPTVVDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYYTIGKEVIDVCLD
PfATub2    HVPRCVFVDLEPTVVDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYYTIGKEIVDICLD
****          *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
HSATub      RIRKLADQCTRLQGFLVFHSGGGTGSGFTSLLMERLSVDYGKKSKLEFSIYPAPQVSTA180
PfATub1    RIRKLADNCTGLQGFLMFSAVGGGTGSGFGCLMLERLSVDYGKKSKLNFCCWSPQVSTA
PfATub2    RVRKLADNCTGLQGFLMNAVGGGTGSGLGCLLLERLAIDYGKKSKLNFCSWSPQVSTA
*:*****:*** *****:*. *****: .*:***:*****:*. *:*****
HSATub      VVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFMVDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLISQIVSSITA240
PfATub1    VVEPYNSVLSTHSLLEHTDVAIMLDNEAIYDICKNLDIERPTYTNLNRLIAQVISLTA
PfATub2    VVEPYNSVLSTHSLLEHTDVAIMLDNEAIYDICKNLDIERPTYTNLNRLIAQVISLTA
*****:***:*** *****:*. *****:*****:*****:*****:*****:*****
HSATub      SLRFDGALNVDLTEFQTNLVYPRIHFPLATYAPVISAEKAYHEQLSVADITNACFEPAN300
PfATub1    SLRFDGALNVDVTEFQTNLVYPRIHFMLSSYAPVSAEKAYHEQLSVSEITNSAFEPAN
PfATub2    SLRFDGALNVDVTEFQTNLVYPRIHFMLSSYAPISAEKAYHEQLSVSEITNSAFEPAS
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
HSATub      QMVKCDPHGKYMACCLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPTGFKVGINYQPP360
ATub1      MMAKCDPRHGKYMACCLYRGDVVPKDVNAAAVATIKTKRTIQFVDWCPTGFKCGINYQPP
ATub2      MMAKCDPRHGKYMACCLYRGDVVPKDVNAAAVATIKTKRSIQFVDWCPTGFKCGINYQPP
*. ***** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
HSATub      TVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAIAEAWARLDHKFDLYAKRAFVHWYVGEGMEEGEFSE420
PfATub1    TVVPGGDLAKVMRAVCMISNSTAIAEVFSRMDQKFDLYAKRAFVHWYVGEGMEEGEFSE
PfATub2    TVVPGGDLAKVMRAVCMISNSTAIAEVFSRMDQKFDLYAKRAFVHWYVGEGMEEGEFSE
***** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
HSATub      AREDMAALEKDYEEVGVDSVEGEGEEGEE--Y
PfATub1    AREDLAALEKDYEEVGIETNDGEGEGEGEYEADY
PfATub2    AREDLAALEKDYEEVGIETNDGEGEGEGEY---
*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

B) Modulation of phosphorylation of *P. berghei* alpha tubulin 1 and 2 isotypes within the 15 min of xanthurenic acid-induced gametogenesis.

Differential levels of phosphorylation are expressed as average log fold increase between two time points (T0 vs T7 min; T7 vs T15 min; T0 vs T15 min). Positive value indicates a decrease of phosphorylation, negative value an increase of phosphorylation. Peptide p-value Cutoff = 0.05. a : Peptide Log Fold Change Cutoff = 0.20. b: Peptide Log Fold Change Cutoff = 0.05. ND: no significant variation of phosphorylation detected. Amino acids in red correspond to the phosphorylation sites of the human alpha tubulin reported in the literature and the corresponding phosphorylation sites in *P. berghei* alpha tubulin 1 isotypes. Blue amino acids correspond to potential new sites of phosphorylation.

	AVG Log Fold		
	T0-T7	T7-T15	T0-T15
Alpha tubulin 1/2 phosphopeptides			
1 : CVFVDLEPTVVDEVRTGTYR	0.436 ^a	-0.1758 ^b	0.2602 ^a
2 : NLDIERPTYNLNR	0.3539 ^a	0.207 ^a	0.561 ^a
3 : QLFHPEQLISGKEDAANNFAR	0.3062 ^a	ND	0.4335 ^a
4 : AVCMISNSTAIAEVFSR	ND	-0.1665 ^b	ND
5 : CGINYQPPTVVPGDLAK	ND	ND	ND
Alpha tubulin 1 phosphopeptide			
6 : GHYTIGKEVIDVCLDRIR	ND	ND	ND
Alpha tubulin 2 phosphopeptides			
7 : SIQFVDWCPTGFK	ND	ND	ND
8 : GHYTIGKEIVDICLDRVR	ND	ND	ND
9 : AYHEQLSVSEITNSAFEPASMMMAKCDPR	ND	ND	ND

Suppl. Figure 3. A) Multiple alignment of human alpha tubulin 1 (A23035) and *P.berghei* alpha tubulin 1 and 2 isotypes (PBANKA_041770 and PBANKA_052270), and **B)** modulation of phosphorylation of *P. berghei* alpha tubulin 1 and 2 isotypes within the 15 min of xanthurenic acid-induced gametogenesis.

B) Modulation of phosphorylation of *P. berghei* beta tubulin within the 15 min of xanthurenic acid-induced gametogenesis.

Differential levels of phosphorylation are expressed as average log fold increase between two time points (T0 vs T7 min; T7 vs T15 min; T0 vs T15 min). Positive value indicates a decrease of phosphorylation, negative value an increase of phosphorylation. Peptide p-value Cutoff = 0.05. a : Peptide Log Fold Change Cutoff = 0.20. b: Peptide Log Fold Change Cutoff = 0.05. ND: no significant variation of phosphorylation detected. Amino acids in red correspond to the phosphorylation sites of the human beta tubulin reported in the literature and the corresponding phosphorylation sites in *P. berghei* beta tubulin. Blue amino acids correspond to potential new sites of phosphorylation.

Beta tubulin phosphopeptides	AVGLogFold		
	T0-T7	T7-T15	T0-T15
1 : GHY T EGAELIDAVLDVVRK	0.6009 ^a	ND	ND
2 : MAV T FVGN S TAIQEMFKR	0.2389 ^a	-0.4873 ^a	-0.2484 ^a
3 : V SDQ F TAMFR	ND	-0.4283 ^a	-0.5095 ^a
4 : AGPFGQLFRPDNFVFGQ T GAGNNWAK	ND	ND	0.1996 ^b
5 : VDVFYNEA T GGR	ND	ND	ND
6 : FMIGFAPL T SR	ND	ND	ND
7 : M S TKEVDEQMLNVQNK	ND	ND	ND
8 : AILMDLEPGTMD S VR	ND	ND	ND
9 : AL T VP E L T QQMFDAK	ND	ND	ND
10 : N SS F VEWIPHN T K	ND	ND	ND
11 : YL T ACAMFR	ND	ND	ND

Suppl. Figure 4. A) Alignment of human beta tubulin (AAB59507) and *P. berghei* beta tubulin (PBANKA_120690), and **B)** modulation of phosphorylation of *P. berghei* beta tubulin within the 15 min of xanthurenic acid-induced gametogenesis.

5.2. Parte II - Deciphering the kinesin 8 role during *Plasmodium berghei* gametogenesis by proteomic and phosphoproteomic approaches

KEYWORDS:

Plasmodium, gametogenesis, exflagellation, quantitative proteomics, phosphopeptide, proteome, phosphoproteome

This manuscript section is shown as paper format in English, at its final development step, and as part of the second thesis' publication.

Abstract

Malaria is one of the most serious and widespread human parasitic diseases that have burden humankind for centuries mainly in subtropical and tropical areas. To reduce its effects to health systems and populations, researches have been focused to the sexual development stages, besides the symptomatic asexual stages, to shed light on cellular processes and regulatory mechanisms underneath the parasite reproductive success. The sexual stages, as the gametogenesis, can work as a bottleneck point for the life cycle development. The malfunction of proteins and regulatory mechanisms in gametogenesis might disturb the life cycle propagation and reduce number of morbid. With the aim to better understand the gametogenesis mechanisms based the gametes production from the point of view of proteins, we have outlined *P. berghei* proteomic and phosphoproteomic comparison approach of normal and mutant microgamete cell line for kinesin 8 motor protein. The gametes were xanthurenic acid produced from gametocytes harvest from mice blood were conducted in independent biological triplicate sample. For this investigation were used iTRAQ labelled peptides, TiO₂ enrichment technique for phosphopeptides, nanoLC/MS-MS Orbitrap Elite Mass Spectrometer analysis and post-processed by PatternLab and Blast2GO bioinformatics for data interpretation. Along the 15 min of differentiation, male gametocytes wild type and mutant were investigated concerning to nuclear reorganization and intracytoplasmic flagellum assembly and regulation. The disrupted organism was metabolically affected in its energy metabolism, response to stress proteins and synthesis of proteins. For the mutant, we have observed functional defects of microtubule assembly that affect chromatin organisation, nuclei individualisation and axoneme assembly.

1. INTRODUCTION

Malaria is one of the most serious and widespread human parasitic disease according to World Health Organization (WHO, 2015c) and possibly the one that has affected humans for longer in medicine history (North, 1896). It has been reported to burden humankind probably before 2700 BC (Cox, 2010a) and worked as a force to recent human evolutionary selection (Kwiatkowski, 2005;Livnat, 2013) in endemic subtropical and tropical areas. Much on pharmacotherapy strategies and vaccine approaches have been done focused on the parasite stages affecting humans, the asexual stages, to mitigate the disease symptomatic condition in most of cases (Flannery et al., 2013). To dip disease burden one must also have called to the importance that *Plasmodium* sexual stage has in mosquitos for parasite propagation and, consequently, morbidly (Arevalo-Herrera et al., 2011;Guttery et al., 2012b;Sinden et al., 2012;Josling and Llinas, 2015).

The sexual development is dependent from function and regulation of a set of proteins as motor ones (Gerald et al., 2011) that if not correctly applied, might disturb the parasite life cycle and the parasite perpetuation (Guttery et al., 2012b). Particularly, for the male gamete of *Plasmodium* that is the only developmental stage that possesses a flagellum. There exist three core motor proteins superfamily encoded by most of organisms that are myosins, kinesins and dyneins (Wickstead and Gull, 2006;Kardon and Vale, 2009). Among them, kinesins are largely held in eukaryotes (Wickstead and Gull, 2006) and play important structural and functional processes in cilia and flagella (Fox et al., 1994) as for mitosis (Gerald et al., 2011). Kinesins are motor enzymes that interact with microtubules and use ATP-hydrolysis energy to move along microtubules (Messin and Millar, 2014) bringing with it cellular vesicles (Yokoyama et al., 2004;Kevenaar et al., 2016), organelles or chromosomes (Hirokawa and Noda, 2008). It has further cellular tasks in morphology shaping, organelle segregation and microtubule regulation (Messin and Millar, 2014;Gergely et al., 2016) as a probable role in distal flagella assembling in Eukaryotes (Johnson and Rosenbaum, 1992;Fox et al., 1994).

Currently, kinesins are classified in 14 families, called kinesin-1 to 14, according to the conserved motor domain (Lawrence et al., 2004) that do not have compulsorily the same function between different organisms (Tomei and Wolniak, 2016) with the exception of the kinesin-5 family involved in the activity of mitotic spindles in plants and animals (Tomei and Wolniak, 2016). Furthermore, kinesin variants can participate in manifoldness of responses and have various end uses by the eukaryotic cells (Gergely et al., 2016) (Gupta et al.,

2006;Messin and Millar, 2014;Shin et al., 2015;Kevenaar et al., 2016) (Wickstead and Gull, 2006). Notwithstanding, it is known that kinesins are important for essential processes within the spermatogenesis of *Marsilea vestita* (Tomei and Wolniak, 2016), for normal flagella function in *Chlamydomonas* (Fox et al., 1994).

The genome of *Plasmodium. berghei* (plasmodb.org), a rodent parasite, show that at least 6 conserved kinesin sequences are annotated but to date, little is known about them: kinesin-5, -7, -13, -19, and two kinesin-8. In efforts to improve our knowledge about male gamete morphogenesis and exflagellation, we focused on the study of kinesin 8 (kin8; PBANKA_0202700), initially identified as male gamete-specific in *P. falciparum* (Khan et al., 2005). Nonetheless, there is no proteome data proving the expression of the second kinesin 8 of *P. berghei* (PBANKA_0805900) and *P. falciparum* (Khan et al., 2005), in gametocyte and gamete. In eukaryote cells, kin8 migrates towards the microtubule plus end terminus, according to its length (Shin et al., 2015), and accumulates there (Gupta et al., 2006;Shin et al., 2015). It might work on microtubules as rescue, pausing or catastrophic events that regulates the length in the course of different biological cycle stages (Messin and Millar, 2014;Gergely et al., 2016). In *P. berghei* gametocytes, kin8 may play role on structural and functional tasks in the cell as flagella regulation (Talman et al., 2014). Since kin8 family members have been implicated in microtubule depolymerisation, notably in the mitotic spindle, Talman *et al.* suggest that in *Plasmodium* kin8 could therefore be contained in the nucleus (Talman et al., 2014).

Gametogenesis of *Plasmodium berghei*, is a rapid process occurring in about 15-20 min and involving 1) xanturenic acid-triggered calcium signalling to activate Ca²⁺-dependent protein kinases; 2) egress of the parasites from the red blood cells (RBC) by lysis of the parasitophorous vacuole and the erythrocyte membranes; 3) three rounds of rapid mitotic DNA replication in male gametocyte associated to the intracytoplasmic axoneme assembly that will produce by an exflagellation process 8 highly motile male gametes from one parental gametocyte (Sinden, 2015b). To improve our knowledge about kin8 functions during male gametogenesis, Depoix et al. (manuscript in preparation) produced kin8-disrupted parasites, named Δ kin8, and studied their phenotype. Male and female gametocytes of mutants were similar to wild-type (WT) parasites. Female gametes could develop normally that is consistent with the exclusive identification of the protein within the male gamete proteome (Khan et al., 2005). Male gametogenesis was however severely impaired. Genome replication occurs but

nuclear division, axoneme formation and male gamete exflagellation abort. The Δ kin8 ultrastructure analysis revealed a default in axoneme assembly: elongated microtubules were seen in longitudinal sections but the classical 9+2 axoneme organisation was never observed. To better understand the molecular mechanisms underlying the ontogenic development of *Plasmodium* gametes and the role of kin8 in this process, we undertook a quantitative and comparative proteomic and phosphoproteomic analysis during the course of the xanthurenic acid-induced gamete development in Δ kin8 and WT *P. berghei*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.10. Parasites

A pyrimethamine-sensitive clone of *P. berghei* NK65 strain (kindly provided by R. Ménard) was used throughout this study to infect mice as described by Janse and collaborators (de Koning-Ward et al., 1998).

2.11. Generation of transgenic disrupted kinesin 8 locus *P. berghei* (Δ kin8 mutant)

Construction of transgenic disruption plasmids

For disruption of *kine8* gene (PBANKA_0202700) by insertion, internal gene sequence was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using genomic DNA from the *P. berghei* NK65 strain and oligonucleotides forward 109 (5'-GGAATTCGAAGGAACCGAACTATTAAATG-3') and reverse 110 (5'-TCCCCGCGGCTGCACCAGTAGCTCCATATG-3') (EcoRI and SacII sites respectively are underlined) and cloned into the vector b3D.DT^H.^D(pl001) (Janse and collaborators) supplied by the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center; MR4/ATCC (Manassas, VA, USA). Recombinant plasmid was linearized by XbaI digestion (nt 544 of the 1165bp insert) (Suppl. Fig. 1).

Parasite transfections and selection of stable transformants

P. berghei transfection has been performed as described in (Janse et al., 2006). Briefly, after overnight culture (37°C, 5%CO₂) of infected blood, mature schizonts were purified using a 55% Nycodenz gradient and collected at room temperature. The mix for electroporation was composed of 10 µL of parasites (containing about 10⁷ mature schizonts), 100 µL of 88A6 Nucleofector solution (Lonza, Europe) and 10 µL DNA (containing 8 µg of digested DNA in TE buffer). Electroporation was performed using the U33 program of the nucleofectorTM electroporator (Lonza, Europe), and electroporated parasites were resuspended in RPMI and injected immediately intravenously into 3 weeks old female Swiss mice. Recipient mice were treated with pyrimethamine in drinking water (0.07 mg/mL), starting 24 h post-electroporation. Pyrimethamine-resistant parasites were subsequently cloned by limiting dilution. Transfection experiments for gene disruption strategy were done twice on different days using different batches of material. Following drug selection two independent clonal populations of Δ kin8 mutant were selected by limiting dilution. Their genotype was validated by PCR (Suppl. Fig. 1) and their phenotype showing an aborting male gamete exflagellation was confirmed (data not shown).

2.12. In vivo *P. berghei* gametocytes production and in vitro gamete exflagellation process.

P. berghei was maintained by cyclic passage in 4-6 weeks old female Swiss OF1 (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Enrichment and purification of gametocytes were achieved using a modified protocol from (Beetsma et al., 1998), as described (Guttery et al., 2012a). Briefly, mice were treated intraperitoneally (ip) with 100 µL of 25 mg/mL phenylhydrazine in saline solution to induce hyper-reticulocytosis (Flanagan J. P., 1970). Two to three days later, mice were infected ip with 10⁷ infected red blood cells (RBC) from a donor mouse. At day 3 post-infection, mice were treated with sulphadiazine (Sigma) at 15 mg/L in drinking water for two days to kill asexual blood stages. On day five post-infection, parasites were mainly constituted of gametocyte stages. Mice were euthanized; blood harvested with heparin and kept on ice to avoid premature activation. Gametocytes-infected RBC were separated from uninfected erythrocytes by a 48% Nycodenz gradient (27.6% w/v Nycodenz in 5 mM Tris-HCl, pH 7.2, 3 mM KCl, 0.3 mM EDTA) in coelenterazine loading

buffer (CLB: containing PBS, 20 mM HEPES, 20 mM Glucose, 4 mM sodium bicarbonate, 1 mM EDTA, 0.1% w/v bovine serum albumin, pH 7.25) during 10 min at 1000 x g. Gametocyte-infected RBC were collected at the interphase, transferred into CLB-containing tubes, centrifuged 1 min at 800xg and the pellet resuspended in CLB, and Giemsa-stained smears realized. One third of the sample was immediately frozen in nitrogen liquid (Time 0) and xanthurenic acid (100 μ M final concentration) was immediately added to the remaining two thirds to activate male gamete exflagellation. A small amount of cell suspension was mounted onto a Malassez chamber to count the RBC number and to follow the exflagellation process under microscope. Half of the sample was frozen in nitrogen liquid after 7 min of incubation at room temperature (RT) and the remainder after 15 min of incubation. Samples were stored at -80°C . All samples were prepared in biological triplicate. Purity was determined on Giemsa-stained smears.

2.13. Sample preparation for LC-MS/MS

Each sample was lysed in 10 volumes μL of 8 M urea containing a complete mixture of protease and phosphatase inhibitor, 2X Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X (Thermo Scientific), through three rapid cycles of freezing in nitrogen liquid and thawing on ice. Lysates were lyophilized and stored at -80°C until use. Lyophilized samples were resuspended in 100 mM TEAB (Fluka), vigorously vortexed and diluted with 4 volumes of ice-cold ethanol. After homogenization, 4 volumes of ice-cold acetone were added. Sample was vigorously vortexed and incubated overnight at -20°C for protein precipitation. Sample was then centrifuged at 13,000 x g, 15 min, at 4°C and the supernatant was discarded. The pellet was washed three times with ice-cold ethanol/acetone/water solution (4/4/2). Proteins were resolubilized in 8M urea in 100 mM TEAB, centrifuged at 13,000 x g, 15 min, at 4°C and the supernatant transferred into a new tube. Proteins were reduced by 20 mM DTT at RT for one hour and alkylated with 40 mM iodoacetamide for another hour. Proteins were first digested at RT by Endoproteinase Lys-C (Sigma-Aldrich) for 12 hours with 0.01AU for 100 μg of proteins. The solution was then diluted with 100 mM TEAB and 10% acetonitrile to a final urea concentration of 1M, supplemented with 1 μg of trypsin per 100 μg of proteins, Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega), for 4 h, at RT. The peptide sample was acidified with TFA 0,1% (v/v) final concentration and desalted using homemade 2 cm long microcolumns of Poros 20 R2 and Oligo R3 packed resins (Applied Biosystems) in p200 tips

(Gobom et al., 1999). Peptides were eluted with 70% acetonitrile/0.1% TFA. Dried up peptides were solubilized in 300 mM TEAB and its concentration was determined by Qubit® quantification assay (Thermo Fischer).

2.14. iTRAQ labelling

Samples were labelled by 4-plex iTRAQ Reagent Multi-plex Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendation. Briefly, 100 µg of peptides of each sample, resuspended in 25 µL of 300 mM TEAB, were added to an iTRAQ label vial already prepared in 70 µL ethanol and incubated 2 h, at RT. Labelling configuration is shown in (label 114: time 0, label 115: time 7 min, label 116: time 15 min). Labelling efficiency was controlled by micro-analysis by mass spectrometry for each labelled sample (1 µL). After normalization, labelled samples were mixed in equal proportion.

2.15. Phosphopeptide enrichment

iTRAQ-labelled phosphopeptides were enriched in batch via TiO₂ affinity chromatography with minor modifications from Thingholm *et al.* (Thingholm et al., 2006; Thingholm and Larsen, 2016). In briefly, iTRAQ-labeled multiplexed samples (around 280 µg per biological replicate) were resuspended in 1 M glycolic acid in 80% acetonitrile/5% TFA (v/v), and 0.6 mg of TiO₂ beads per 100 µg of peptide sample then incubated under vigorous shaking for 10 to 15 min. Beads were spun down and the supernatant was transferred to new microtubes. Additionally, new bunch of TiO₂ beads was added to the supernatants (using 0.3 mg TiO₂ per 100 µg of peptide). That procedure was repeated two times. The TiO₂ beads from the three rounds of enrichment were combined and washed twice with 80% acetonitrile/1% TFA (v/v) and then phosphopeptides were eluted by 0.28% ammonia solution, pH 11, and dried out.

2.16. LC-MS/MS

Phosphopeptide enriched fraction and not enriched ones were analyzed in biological triplicate with two technical repetitions each using a Dionex Ultimante™ 3000 RSLCnano system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) coupled online with an LTQ-Orbitrap mass spectrometer, Orbitrap Elite™ (Thermo Scientific, San Jose, CA). Sample were first loaded onto a 200 μm x 100 μm fused silica emitter trap column in-house packed with Reprisil-Pur 120 Å C18-AQ 5 μm resine (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany) and then fractionated by 35 cm reverse phase capillary column made by fused silica emitter (75 μm inner diameter) packed in-house with Reprisil-Pur 120 Å C18-AQ 3 μm resine (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany). In brief, peptides in 0.1% (v/v) formic acid were injected onto the trap column with 98% solvent A (0.1% formic acid in water) and 2% solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile) under flow rate of 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. After washing, peptides were resolved over 210 minutes with 230 nL/min flow rate in analytical column through use of organic gradients: 2-40% solvent B until 170 min; and then 40-85% until 185 min; 85% until 190 min; and at least 2% until 210 min. Peptides were ionized by Nanospray Flex™ ion source (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ionization at 2.5 kV and a capillary temperature of 275 °C.

2.17. Data processing

Data were acquired in a positive mode by Data-Dependent Acquisition (DDA) operated by the software Xcalibur 2.2 SP 1.78 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). DDA survey scans were set to 120.000 FWHM, m/z of 400, in the m/z range of 300 to 1800 and the top 15 multiply charged ions in each duty cycle selected for MS/MS fragmentation using higher-energy collisional dissociation (HCD) with a normalized collision energy of 50%, and 35% in technical replicate.

2.18. Data analysis

The PatternLab v.4.0.0.27 was used for identification and quantitative comparison of proteins. The search used to compare experimental spectra against theoretical generated ones

from database was carried out through Comet MS/MS search engine v. 2015.020 implemented in PatternLab.

The database used was a combination of 5,143 protein sequence of *Plasmodium berghei* ANKA downloaded from PlasmoDB, 55,957 sequences of *Mus musculus* downloaded from NCBIInr and 127 common contaminants to proteomic experiments proposed by Patternlab's FastaDBXtractor v.1.0. The false discovery rate was then estimated from reverse target-decoy sequence generated.

In accordance to parameters suggested by Carvalho *et al.* (Carvalho et al., 2016), all files in .raw format were subjected for PSM and search parameters setted up were semi-tryptic and tryptic peptides hydrolytic enzyme specificity, tolerance of two missed cleavages, carbamidomethylation of cysteines and N-terminus iTRAQ-4plex tagging of lysine residues as fixed modification, iTRAQ-4plex in tyrosine as variable modification, Fragment bin tolerance of 1.0005, MS/MS accuracy of 0.4 Da, M peak only as Theoretical fragment ion and search range comprising the mass range of 550 to 5,500. Phosphorylation of serine, threonine and tyrosine amino acid residues as variable modification was used additionally in PSMs searches of phospho-enriched peptides.

A statistical filtering and validation of peptide spectrum matches was performed using PatternLab in-house Search Engine Processor in order to meet a subset of protein sequences that satisfies a FDR < 1%.

The PSM results from all replicates were tied in in protein groups. For quantitative analysis, only proteins with a minimum of two peptides per protein and peptide with average log fold change of 0.2 and p-value of 5% was regarded for whole proteome differential analysis. For phosphoproteome quantitative analysis and general list of proteins identification reckoned, one peptide was accepted as enough with caution and manual assessment.

2.19. Gene Ontology

The functional categorization of proteins was assessed using Blast2GO software v.3.3.0 (Oracle Corporation). The primary sequence of each protein identified by PSM was exported from PatternLab in fasta format and blasted by Blast2GO using default parameters

with exception of Word Size of 3 and number of hits increased to 30. All alignments were done using BlastP v2.2.31+ service from CloudBlast (BioBam Bioinformatics S.L. Valencia, Spain) and all organisms in NCBIInr database.

2.20. Ethical compliance

All the experiments using rodents in this study were carried out according to European regulations in compliance with the French guidelines and regulations, and approved by the Ethic Committee CUVIER (authorization n°68-007).

3. RESULTS

3.1. Proteomic and phosphoproteomic description of Δ kin8 mutant line

The methodology for enrichment of gametocyte-infected RBC followed by gametogenesis induction by xanthurenic acid was successfully employed to monitor biological processes affected in Δ kin8 parasites when compared to the normal WT parasites. As previously described (Garcia et al., Submitted), the experiment was performed at time 0 corresponding to gametocyte-infected RBC; time 7 min after induction corresponding to intermediate forms and time 15 min after induction corresponding to mature gametes. The relative comparative proteomic analysis was performed between the 2 lines during the gamete morphogenesis and at each time point of this cell development process (Figure 1).

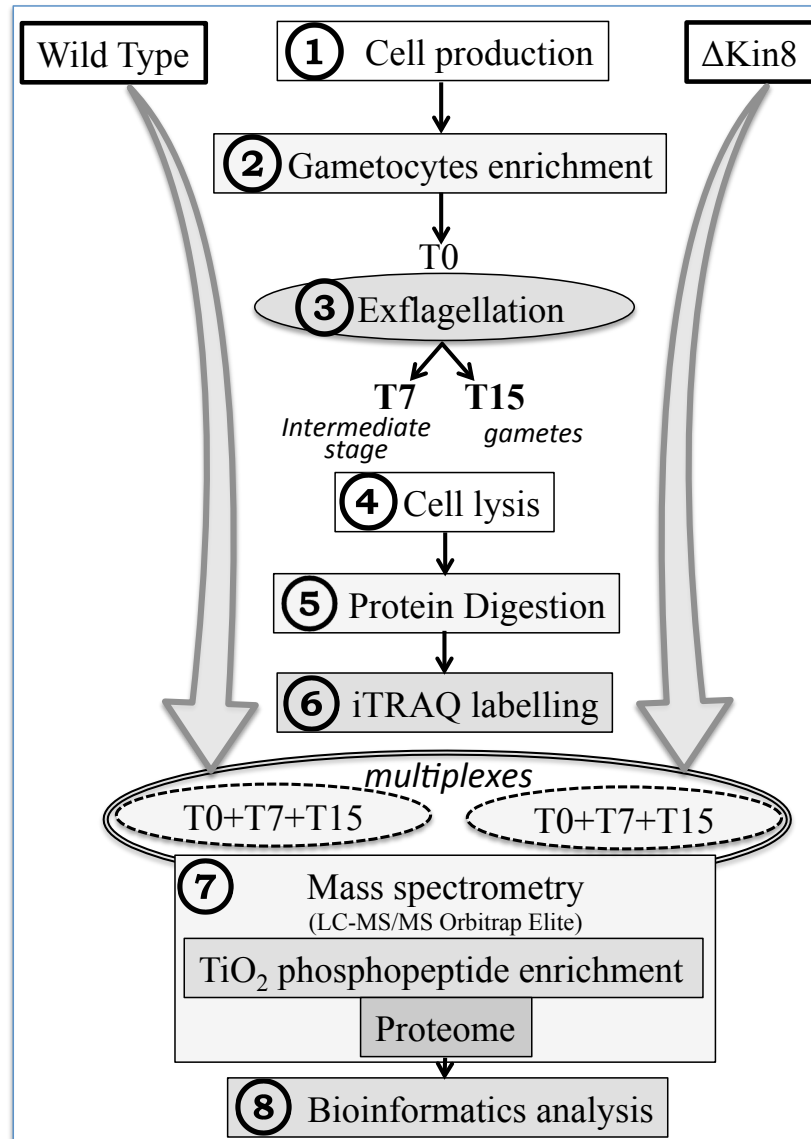


Figure 1. Experimental design and setup for comparative proteomic and phosphoproteomic analysis. WT and $\Delta kin8$ *P. berghei* gametocyte-infected RBC were harvested from mice (1), gametocytes were enriched by NycoDenz density gradient (2), exflagellation triggered by xanthurenic acid (3) and then sample obtained in 3 distinct time points: 0 min, 7 min and 15 min. For each time collected, the parasites were lysed in 8 M urea (4) and then proteins subjected to tryptic digestion (5). The resulted peptides were labelled by iTRAQ reagent resulting in multiplexes (6). Sample aliquots were applied to phosphopeptides enrichment through TiO_2 micro-chromatography and then iTRAQ- labelled phosphopeptides and peptides were subjected to LC-MS/MS analysis (7). Spectra were interpreted by mass spectrometry softwares (8).

From our finding by iTRAQ labelling-based proteomic and phosphoproteomics experiments, 530 proteins from 3,198 peptides (FDR < 0.5%) (Suppl. Table S1) and 218

phosphoproteins from 735 phosphopeptides (FDR = 0%) were identified in Δ kin8 mutants (Suppl. Table S2). In WT parasites, 206 phosphoproteins over a total of 443 proteins were identified (Garcia et al., Submitted). The ratio of phosphoproteins identified over total proteins is close between Δ kin8 (41%) and WT (46%) parasites demonstrating a high association of phosphorylation/dephosphorylation processes in sexual stages of both parasite lines. Furthermore, 462 mouse blood proteins were identified from 1,344 peptides, whose 176 phosphoproteins from 243 phosphorylated peptides.

3.2. Global relative quantitative comparative analysis between Δ kin8 and WT parasites through gametogenesis

All protein sequences identified from the Δ kin8 parasites were retrieved by Blast2GO software. In order to have an overall view we performed an in-depth GO analysis and not GO slim, which explains why proteins are listed in several categories. As depicted in Figure 2A-C, Δ kin8 parasites shared the majority of the GO categories observed with WT parasites (Garcia et al., Submitted). The majority of proteins are integral components of membrane showing that our sample preparation method was efficient in recovering hydrophobic proteins as previously described (Garcia et al., Submitted). The most recurrent molecular functions of proteins are molecule-binding functions. The most abundant biological processes for both lines are related to RNA translation and protein synthesis, and metabolic activity.

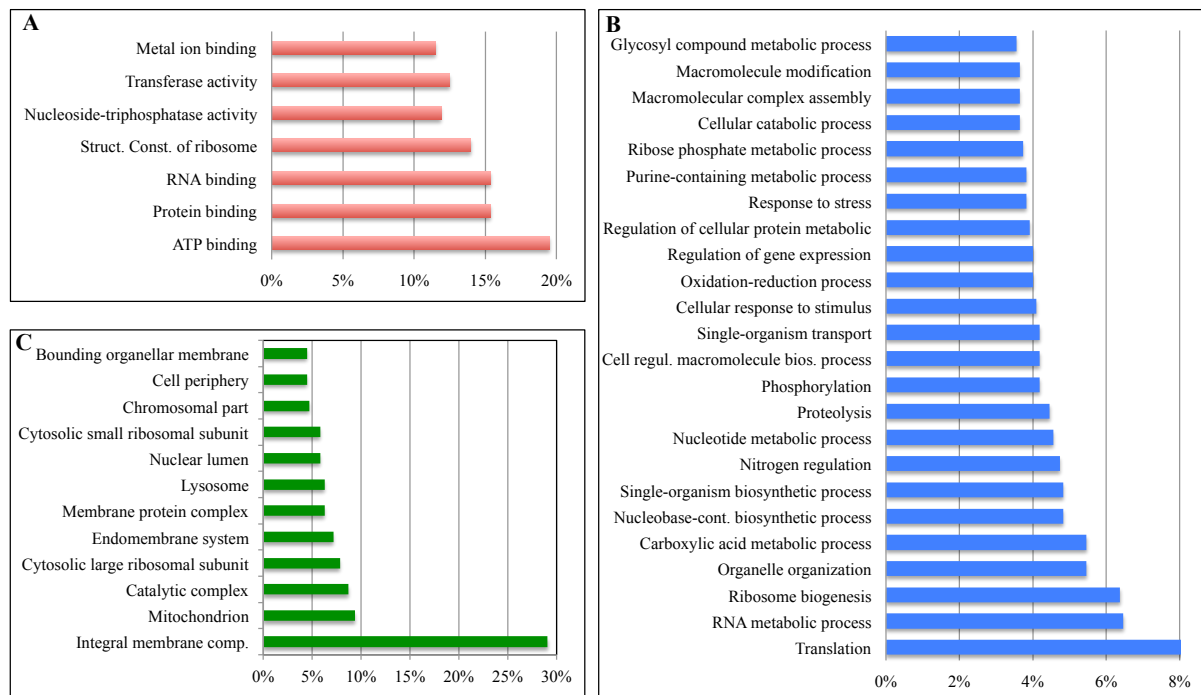


Figure 2. Comparison of regulated proteins and phospho-regulated proteins displayed in WT and Δ kin8 parasites during gametogenesis. Venn set of proteins regulated (A) and phosphoregulated (B) and GO categorization of the proteins regulated (C) and phospho-regulated (D) in each line.

The two lines shared 382 proteins (Fig. 3B) corresponding to 86% and 72% of the total of WT and Δ kin8 parasite proteins, respectively and 149 phosphoproteins corresponding to 72% and 68% of the total of WT and Δ kin8 parasite proteins, respectively (Figure 3D).

In our experimental conditions, proteins and phosphoproteins only found in one parasite line, Δ kin8 or WT, respectively named here Δ kin8-detected and WT-detected proteins and phosphoproteins, through the gametogenesis were GO-categorized. These proteins were not found in the other parasite line because either the expression level is too low to be detected by our approach or the protein is unexpressed. No protein and phosphoprotein just found in one parasite line was classified in energy-producing metabolism process, in particular glycolysis. While a majority of Δ kin8-detected proteins and WT-detected proteins and phosphoproteins are listed in several processes related to biosynthesis of DNA, RNA and proteins, showing an important differential regulation of acid nucleic and protein synthesis (Fig. 3 A-C).

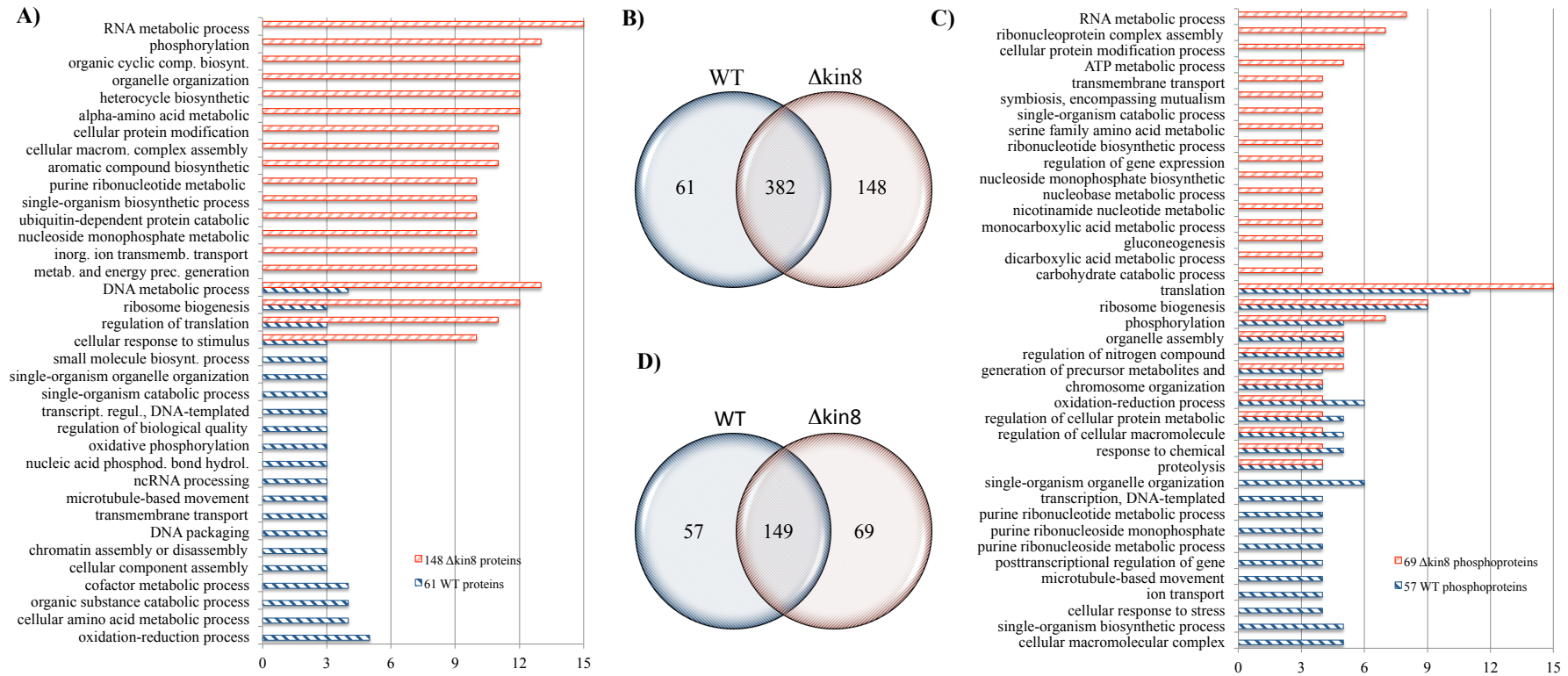


Figure 3. Comparison of total identified proteins and phosphoproteins displayed in WT and Δ kin8 parasites during the gametogenesis. Venn sets of shared proteins (B) and phosphoproteins (D) between both lines and the GO categories of proteins (A) and phosphoproteins (C) found only in each line.

Proteins and phosphoproteins not detected in Δ kin8 parasite line

Remarkably, several WT-detected proteins were assigned as microtubule dynamic-dependant processes: microtubule-based movement, cellular component and chromatin assembly/disassembly, and as DNA packaging (Fig. 3 A-C).

The three proteins belonging to Microtubule-based movement were kin8 (PBANKA_020270), the object of our study, confirming the gene disruption, kinesin 13 (PBANKA_145830) and one dynein heavy chain (PBANKA_092540) of the axoneme outer dynein arm (Talman et al., 2014). Dyneins are widely conserved and identified in the eukaryotic flagellum. Kinesins 8 and 13 were found previously in male gametocytes and gametes, and may play a role in mitosis and/or in flagellar regulation (Talman et al., 2014).

Nucleosome proteins, histone H2B (H2B.Z; PBANKA_142060) and two histone 3 variants (PBANKA_010880 and H3.3; PBANKA_111710), and the unknown protein PBANKA_103880 with a EGF-like domain, clustered in chromosome assembly/DNA packaging and have not been found in Δ kin8 parasites. The histone binding protein N1/N2 (“conserved Plasmodium protein”, PBANKA_093030) was enriched in WT parasites compared to Δ kin8 parasites by dioxido titanium affinity underlying the importance of histone phosphoregulation in WT parasites.

Besides chromatin regulation, the abundance of motility microtubule-based and structural-based proteins were affected in Δ kin8 parasites as well as at the proteome than the phosphoproteome level. Alpha tubulin 2, which is used as male-specific marker for *P. berghei* gametocytes, has a differential abundance variation incremented of 90% of phosphopeptides in Δ kin8 parasites compared to WT while the phosphorylation level of beta tubulin is reduced of about 22% in the mutant when compared to the wild type. We were also able to identify phosphopeptides from kin8 (PBANKA_020270) as 40S ribosomal protein S28e (PBANKA_132500), 60S ribosomal protein L3 (RPL3) (PBANKA_051190) serine repeat antigen 3 (SERA3) (PBANKA_030490) in WT parasites, absent in Δ kin8 parasites. It brings evidences that shed light on the involvement of phosphoregulations in the abnormal Δ kin8 mutant phenotype.

Proteins and phosphoproteins found just in Δ kin8 parasite line

In addition to molecule biosynthesis processes, several Δ kin8-detected proteins were assigned in two specific processes, ubiquitin-dependent protein catabolic process (some of them repeated in cellular protein modification process as well) and organelle organisation process (Fig. 3 A-C).

Abnormal or short-lived proteins are targeted for degradation by the proteasome via the posttranslational modification ubiquitination. *P. falciparum* 26S proteasome components and a bacteria-like proteasome are involved in protein degradation (Chung et al., 2012). 26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT3 (PBANKA_071560), 26S protease regulatory subunit 7 RPT1 (PBANKA_141000), 26S proteasome regulatory subunit RPN7 (PBANKA_091900) and 26S proteasome regulatory subunit RPN11 (PBANKA_114400) belong to the 26S proteasome in which the majority of selective cellular protein proteolysis takes place. The ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2 (PBANKA_123150), up-regulated in Δ kin8 parasite, might deubiquitinates polyubiquitinated target proteins. The two proteasome subunits alpha type-6 (PBANKA_122310) and beta type-7 (PBANKA_134330) contribute for a complete assembly of 20S proteasome subunit of the 26S proteasome. In addition, the ubiquitin-activating enzyme E1 (UBA1; PBANKA_144070) was classified in this process.

Some proteins in the organelle organisation process are microtubule-associated proteins, like dynein light chain 1 (PBANKA_142940) of the axoneme inner dynein arm (Talman et al., 2014) and the unknown protein (PBANKA_143150), that the sequence reveals to be a radial spoke head protein 9 homolog. In human patients with primary ciliary dyskinesia, a common mutation in the radial spoke head protein-encoding gene *RSPH9* gives rise to cilia dysmotility associated with central-microtubular-pair abnormalities (Reish et al., 2010). In *Chlamydomonas*, flagella of mutants deficient in entire radial spokes or spoke heads are paralyzed (White et al., 2005). Dynein light chain 1 and RSPH9 are structural proteins found inside the axoneme, known to play a role in the mechanical movement of the flagellum/cilium organisms. Regulation of motile 9+2 cilia and flagella depends on interactions between radial spokes and a central pair apparatus. When having improperly inner arm and radial spoke organization, flagellum/cilium organisms have high risks of abnormalities of motile flagella/cilia.

Other are listed as chromosome associated protein, like histone H4 (PBANKA_094190) and the uncharacterized protein (PBANKA_071600) that the sequence reveal to be an homolog to the structural maintenance of chromosome protein 3 (SMC-3) of the cohesion complex of eukaryotes that is required for sister chromatid cohesion during mitosis and meiosis (Hirano, 2006). In parallel the Δ kin8 parasite triggered the synthesis of DNA topoisomerase 2 (PBANKA_101140) that regulates DNA supercoiling and separates interlocked chromosomes, and of DNA replication licensing factor MCM7 (PBANKA_080310). In *P. falciparum* minichromosome maintenance complex (MCM) plays a key role in the transition of pre-replication complex (before DNA synthesis) to the replication complex (Patterson et al., 2006). The overexpression of MCM7 subunit has been reported in various premalignant dysplastic lesions and cancers and in *Plasmodium* its expression is up-regulated during the DNA replication of the intraerythrocytic cycle (Ansari and Tuteja, 2012). Finally, DNA mismatch repair protein MSH2 (PBANKA_080430) is involving in the system for repairing damage that can occur during DNA replication and recombination.

Δ kin8 parasite also presents phosphoregulation of the nuclear proteins ATP-dependent RNA helicase DDX6 (DOZI) (PBANKA_121770) and DNA/RNA-binding protein Alba 3, putative (ALBA3) (PBANKA_120440). DOZI and ALBA 3 are associated proteins. The first is related to later female gametocyte translation (Mair et al., 2010) and both are assigned to ribosome biogenesis and genome repair and maintenance (Reddy et al., 2015). According to our previous study (Garcia et al., Submitted), those proteins would be related to NAPS, Chromatin assembly factor protein WD40, eIF4A and Histone H2B for DNA replication, transcription, repair and parasite-host interaction. The hypothesis of association to ribosome biosynthesis would be corroborated by two others ribosomal proteins found phosphorylated in the mutant and absent in the wild type: 60S ribosomal protein L13-2 (PBANKA_142350) and 60S acidic ribosomal protein P2 (PBANKA_040770).

3.3. Global description Δ kin8 regulated proteins and phosphoproteins compared to WT in time-course experiment

Protein and phosphoprotein relative quantification was obtained through iTRAQ labelled peptides for each cell line, and samples were analysed in biological triplicate. There were 59 regulated proteins and 37 phospho-regulated proteins from Δ kin8 parasites in three time intervals of differentiation (T0-T7; T7-T15; T0-T15). Compared to the 52 regulated and 39 phospho-regulated proteins from WT parasites (Garcia et al., Submitted), both lines shared 36 regulated proteins and 17 phospho-regulated proteins during gametogenesis (Fig. 4 A-B). Those shared proteins in common between WT and Kin8 proteome and phosphoproteome are related mainly in RNA translation and protein biosynthesis, cellular homeostasis and energetic metabolism as reported for WT parasites (Garcia et al., Submitted).

Here we would like to highlight the 23 and 19 proteins, and 20 and 22 phosphoproteins that were restrictedly modulated in Δ kin8 and WT parasites, respectively, when no modulation was observed in the other line (Fig. 4 A-D). The majority of these line-specific modulated proteins and phosphoproteins were classified in the same main cell processes, RNA translation and protein biosynthesis, cellular homeostasis and energetic metabolism (Fig. 4 C-D). Nonetheless, some line-specific modulated proteins and phosphoproteins are categorised to cell processes related to the mutant phenotype (Fig. 4 C-D). For example, WT-specific modulated proteins are related to cell motility/ cytoskeleton organization (profilin, PBANKA_083300), cell differentiation/ reproduction (nascent polypeptide associated complex alpha chain, PBANKA_112070), and one WT-specific modulated phosphoprotein is related to cell division (cell division cycle protein 48 homologue, PBANKA_111860). One Δ kin8-specific modulated protein is related to chromosome organization (histone H2A, PBANKA_111700). Consequently these differences in the expression and phosphorylation modulations throughout the cell differentiation reflect the global disorganisation produced in the mutants as an indirect effect.

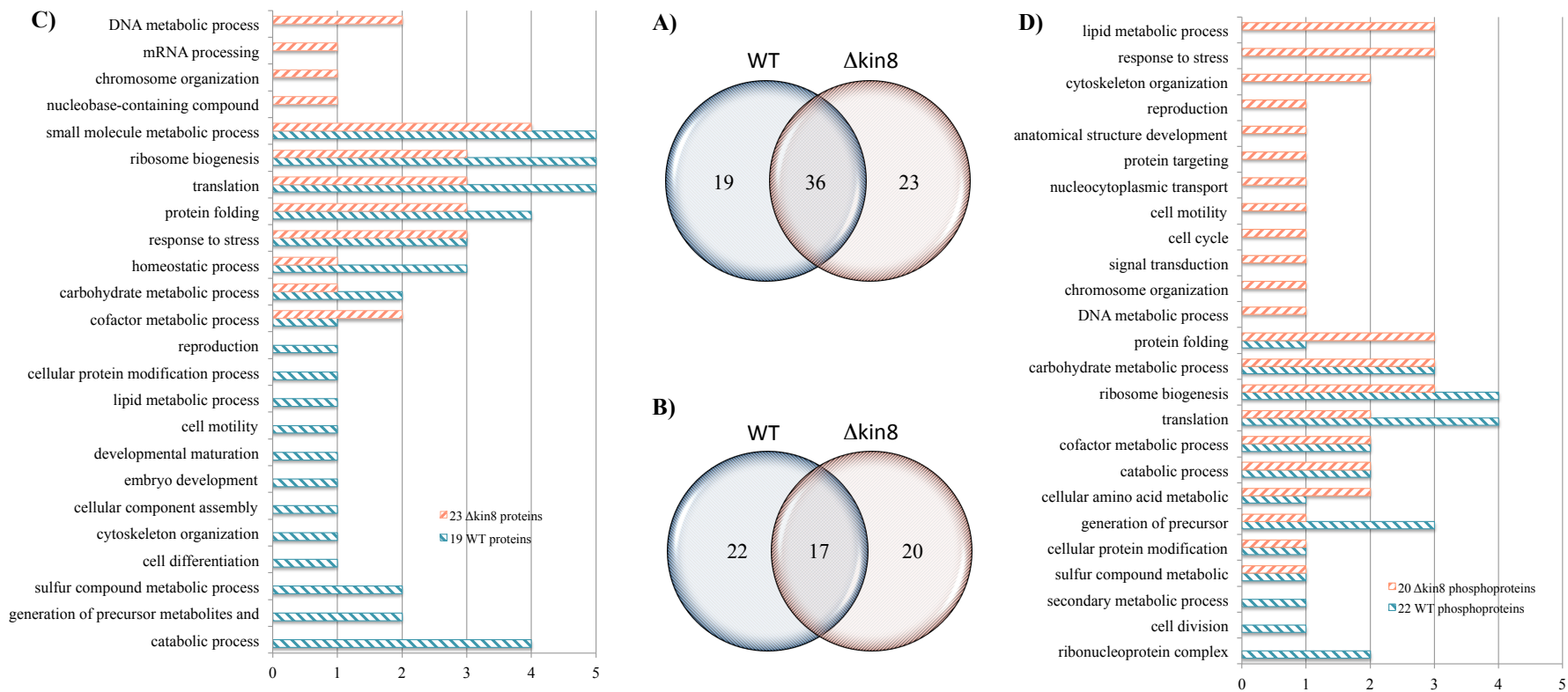


Figure 4 Comparison of regulated proteins and phospho-regulated proteins displayed in WT and Δ kin8 parasites during gametogenesis. Venn set of proteins regulated (A) and phosphoregulated (B) and GO categorization of the proteins regulated (C) and phosphoregulated (D) in each line.

3.4. Time-specific comparison between Δ kin8 and WT parasite lines

In order to compare the protein and phosphoprotein abundance differences between Δ kin8 and WT within gametogenesis, we performed a time-dependent pairwise quantitative and comparative analysis at each time T0, and T7 and T15 post induction.

The 37 proteins that have displayed an abundance difference between Δ kin8 and WT parasites along time points of the differentiation can be clustered in 6 main important cell processes: host cell hemoglobin degradation and proteolysis, energy metabolism, cytoskeleton and cell motility, nucleic acid and protein synthesis, host interaction and egress, stress and protein folding and one unknown conserved *Plasmodium* protein (Table 1). All categories have large variation between cell conditions subjected in the current study.

The most severely affected processes were nucleic acid and protein synthesis and stress and protein folding. The large HSP abundance fluctuation observed among development times evidences that Δ kin8 parasites are responding to unfavourable/abnormal developmental conditions.

Concerning the energy metabolism process, globally the Δ kin8 parasites produced less glycolysis enzymes than the WT parasites. This could reflect that the WT parasites need more quantity of energy per cell when compared to Δ kin8 parasites to differentiate and exflagellate, and that the Δ kin8 parasite has a slower metabolism activity (Table 1).

Among the modulated processes, cytoskeleton and cell motility would be directly affected by kin8 disruption since it is about motor protein interference involved to manifold related cellular processes. Δ kin8 parasite has strong deregulation of the most dynamic component of the cytoskeleton and axoneme, the microtubules. Moreover the microtubules are dynamically phospho-regulated by serine and threonine phosphorylation (Fourest-Lieuvin et al., 2006; Wang et al., 2014; Garcia et al., Submitted). The phosphor-regulation is abnormal in mutant since we can observe remarkable variation in phosphoprotein abundance between both groups (Table 2).

Wherefore, we have found alpha tubulin I (PBANKA_041770) and tubulin II (PBANKA_052270) as very up-regulated in Δ kin8 parasites and on contrary, we have found in our experiment that tubulin beta chain (PBANKA_120690) was down-regulated in Δ kin8 parasites. The modulation of the 3 proteins was striking at T7. Alpha tubulin 1 and 2, and tubulin beta were found to show increased expression during the gametogenesis of WT parasites (Garcia et al., Submitted).

Moreover two proteins, male development gene 1 (MDV1) and osmiophilic body protein (G377) important for the egress were found up-regulated in the Δ kin8 parasites through gametogenesis at each time point. To egress, the gametocytes must lyse the two external membrane barriers, the parasitophorous vacuole membrane produced by the parasite and the red blood cell membrane. The sequential inside-out lysis occurs in response to the exocytosis of specialized secretory vesicles only present in the gametocyte including the osmiophilic bodies (Kehrer et al., 2016). In fact, in WT parasites G377 was rapidly down regulated suggesting that the egress of female gametocyte happens earlier during the gametogenesis (Garcia et al., Submitted).

Table 1: Abundance variation of proteins through time point comparison. According to colour scale, abundance variations were represented in a heatmap representation for easy visualization of time point abundance differential variation.

Cell process	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA accession number	WT / Δ kin8		
		T0	T7	T15
Host cell hemoglobin degradation and proteolysis	PBANKA_144900 aspartyl protease, putative protein length=577	-69%	-101%	114%
	PBANKA_061030 polyubiquitin, putative protein length=229	-	7%	-23%
Energy metabolism	PBANKA_111770 malate dehydrogenase, putative (MDH) protein length=313	63%	-22%	68%
	PBANKA_112560 pyruvate kinase, putative protein length=511	3%	5%	62%
	PBANKA_130860 fructose-bisphosphate aldolase 2 (ALDO2) protein length=369	73%	10%	21%
	PBANKA_132640 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, putative (GAPDH) protein length=337	39%	-35%	1%
	PBANKA_121430 enolase, putative (ENO) protein length=446	-14%	1%	66%
	PBANKA_134010 L-lactate dehydrogenase (LDH) protein length=316	64%	6%	29%
	PBANKA_134040 oxidoreductase, putative protein length=334	-28%	21%	21%
Cytoskeleton and cell motility	PBANKA_120690 tubulin beta chain, putative protein length=445	-7%	52%	8%
	PBANKA_041770 alpha tubulin 1 protein length=453	-	-15%	-35%
	PBANKA_052270 alpha tubulin 2 protein length=450	5%	-30%	9%
Nucleic acid and protein synthesis	PBANKA_121770 ATP-dependent RNA helicase DDX6 (DOZI) protein length=433	-90%	-	-62%
	PBANKA_020300 chromatin assembly factor 1 protein WD40 domain, putative protein length=446	37%	-3%	28%
	PBANKA_113330 elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443	43%	-5%	-9%
	PBANKA_113340 elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443	43%	-5%	-9%
	PBANKA_131480 elongation factor 2, putative protein length=832	39%	93%	52%
	PBANKA_136030 DNA/RNA-binding protein Alba 4, putative (ALBA4) protein length=374	-74%	-1%	-
	PBANKA_091800 60S acidic ribosomal protein P0, putative protein length=315	-	-117%	2%
	PBANKA_114170 ubiquitin-60S ribosomal protein L40, putative protein length=128	-	7%	-23%
	PBANKA_111300 purine nucleoside phosphorylase, putative (PNP) protein length=244	43%	14%	-
	PBANKA_143920 polyadenylate-binding protein, putative (PABP) protein length=834	-108%	-12%	6%
	PBANKA_061160 ribonucleoside-diphosphate reductase, large subunit, putative protein length=847	-	20%	4%
	PBANKA_101670 conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=279	-	-19%	3%

Host interaction and egress	PBANKA_146300 osmiophilic body protein (G377) protein length=2606	-	79%	-107%
	PBANKA_143220 male development gene 1 (MDV1) protein length=214	-32%	-59%	-82%
Stress and protein folding	PBANKA_071190 heat shock protein 70 (HSP70) protein length=693	18%	0%	7%
	PBANKA_081890 heat shock protein 70, putative protein length=651	-33%	54%	-80%
	PBANKA_091440 heat shock protein 70, putative (UIS24) protein length=663	-	30%	-16%
	PBANKA_080570 heat shock protein 90, putative (HSP90) protein length=720	57%	-26%	72%
	PBANKA_111860 cell division cycle protein 48 homologue, putative protein length=815	42%	-36%	101%
	PBANKA_070280 protein disulfide isomerase protein length=482	-	39%	-6%
	PBANKA_143730 endoplasmic reticulum chaperone protein (GRP94) protein length=808	-	17%	0%
	PBANKA_093840 endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein, putative protein length=342	47%	-	135%
	PBANKA_121650 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative (CYP19A) protein length=170	113%	-47%	34%
	PBANKA_093220 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative protein length=192	-74%	-49%	-
Unknown	PBANKA_082670 conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=222	-	-92%	14%

Colour scale

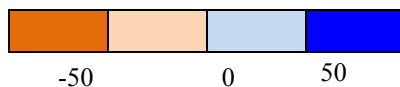
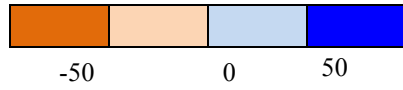


Table 2: Abundance variation of phosphoproteins through time point comparison. According to colour scale, abundance variation were represented in a heatmap representation for easy visualization of time point abundance differential variation.

Cell process	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA accession number	WT / Δ kin8		
		T0	T7	T15
Host cell hemoglobin degradation and proteolysis	PBANKA_093420 ubiquitin domain-containing protein DSK2, putative (DSK2) protein length=375	-	204%	183%
	PBANKA_100610 flap endonuclease 1, putative (FEN1) protein length=479	-	-	-54%
Energy metabolism	PBANKA_112560 pyruvate kinase, putative protein length=511	-	94%	104%
	PBANKA_092810 phosphoglycerate mutase, putative (PGM1) protein length=250	-	-	194%
	PBANKA_121430 enolase, putative (ENO) protein length=446	-	44%	-
	PBANKA_130380 triosephosphate isomerase, putative (TIM) protein length=248	72%	-	-
Cytoskeleton and cell motility	PBANKA_120690 tubulin beta chain, putative protein length=445	-	-	22%
	PBANKA_052270 alpha tubulin 2 protein length=450	-	-	-90%
Nucleic acid and protein synthesis	PBANKA_142330 DNA/RNA-binding protein Alba 1, putative (ALBA1) protein length=242	-	-	104%
	PBANKA_135920 DNA/RNA-binding protein Alba 2, putative (ALBA2) protein length=202	72%	-	265%
	PBANKA_113340 elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443	44%	57%	13%
	PBANKA_113330 elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443	44%	57%	13%
	PBANKA_093770 60S ribosomal protein L36, putative (RPL36) protein length=113	-	-	164%
	PBANKA_110670 60S ribosomal protein L4, putative (RPL4) protein length=411	-	-	298%
	PBANKA_093030 GTP-binding nuclear protein RAN/TC4, putative protein length=214	-	-69%	-
	PBANKA_130130 trailer hitch homolog, putative (CITH) protein length=337	-	-	-89%
	PBANKA_113570 RNA-binding protein, putative protein length=511	-	-	-69%
	PBANKA_143920 polyadenylate-binding protein, putative (PABP) protein length=834	-37%	-	-59%
PBANKA_060430 conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=330	-	-	26%	
Host interaction and egress	PBANKA_143220 male development gene 1 (MDV1) protein length=214	-	-126%	-146%
Stress and protein folding	PBANKA_121650 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative (CYP19A) protein length=170	-	-	34%
	PBANKA_081890 heat shock protein 70, putative protein length=651	79%	6%	-
	PBANKA_071190 heat shock protein 70 (HSP70) protein length=693	305%	-	-97%
	PBANKA_080570 heat shock protein 90, putative (HSP90) protein length=720	-	-	-106%

	PBANKA_111860 cell division cycle protein 48 homologue, putative protein length=815	-	-	-24%
Unknown	PBANKA_030130 conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=91	-	74%	-

Colour scale



4. DISCUSSION

The kinesin-8 family of motors is thought to mediate chromosome movements through a combination of translocation and microtubule depolymerisation activities in budding yeast (Kip3 protein) (Gupta et al., 2006; Varga et al., 2006) and in human cell (Kif18 protein) (Zhu et al., 2005; Stumpff and Wordeman, 2007). E. g. the human Kif18 is involved in regulating the process of chromosome alignment, referred to chromosome congression and considered to be essential for cell viability. Depletion of Kif18A affects kinetochore movements and results in mitotic cells with abnormally long mitotic spindles that fail to congress chromosomes at the metaphase plate. Kif18 is not essential for the establishment and/or maintenance of kinetochore-microtubule attachment, but is required for judging tension across kinetochore pairs. Recently, the two kinesin 8, Klp5 and Klp6, in the fission yeast were shown to contribute on microtubule dynamics, kinetochore attachment stability and sliding force in the mitotic spindle (Gergely et al., 2016). In addition to aberrant chromosome pushing movements, occasional cells lacking Klp5 contained three spindle pole bodies and tripolar mitotic spindles. It was observed that the absence of kinesin-8 in organisms causes cellular polarity defect and longer mitotic spindles but that is not always the case (Messin and Millar, 2014; Gergely et al., 2016). In the amoeba *Dictyostelium discoideum*, for example, the kinesin 8 kif10 is not essential for development or viability and appears to cooperate with dynein to organize the interphase radial microtubule array (Gergely et al., 2016). This is relevant because *D. discoideum* possesses 13 kinesin-8 isoforms that suggests a functional redundancy of motor isoforms in this organism. Moreover, the variability in reported roles of kinesin 8 members suggest that their effects may be different in different organisms (Gergely et al., 2016).

In *P. berghei*, gene disruption for one of the two kinesin 8 members, the one that known to be expressed during gametogenesis by proteome data (Khan et al., 2005), induces defects of microtubule assembly affecting the male gamete morphogenesis and the exflagellation process and consequently reproduction (Depoix et al. manuscript in preparation). Kinesin-8 is thus important for normal parasite DNA replication and gamete differentiation. Our study shows that Δ kin8 gametocyte is metabolically active until the last time lapse observed, 15 min post induction for gamete production, even if very distinct metabolic conditions and proteome are observed compared to WT parasites. Specifically,

Δ kin8 gametocytes performed all the three DNA replication cycles but daughter nuclei did not individualize (Depoix et al., manuscript in preparation). In other cellular models kin8 depletion disturbed the mitotic spindle length and the alignment of chromosomes in the metaphase and induced default in chromosome congression. This phenomena could be involved in the phenotype observed in *P. berghei*. However, the way chromatin is organized inside the nucleus of eukaryotic cells is a key factor in gene control and chromosomal organization and dynamic as well as gene positioning could influence spatiotemporally gene expression in bacteria (Sobetzko et al., 2012) and in Eukaryotes (Spector, 2003; Schneider and Grosschedl, 2007) and in *Plasmodium* (Duffy et al., 2012). Such an implication could explain the high number of modulated proteins related to the gene expression in Δ kin8 parasites compared to WT parasites. This is well illustrated by the higher quantity of proteins and proteins modified posttranslationally by phosphorylation clustered in the acid nucleic and protein processes (Fig. 2-4, Table 1).

Concomitant to the three rounds of DNA replication, WT male cells differentiate with an intracytoplasmic axoneme formation and exflagellate, releasing eight male gametes. While Δ kin8 parasites shows assembly of single or doublet of microtubules but axonemes were not formed or highly disorganised. *Plasmodium* encode one beta-tubulin and two alpha tubulin isotypes (I and II) (Kooij et al., 2005). Alpha tubulin I is expressed by every *Plasmodium* stage, except in sporozoite stage, and has higher abundance in female than male gametocytes (Kooij et al., 2005). It has great sequence similarity to alpha tubulin II 95% (Schwank et al., 2010) and its most notable difference is the three well conserved C-terminal amino acids and the terminal tyrosine residue lacking in alpha tubulin II (Kooij et al., 2005). Researchers have reported that alpha tubulin II is expressed in *Plasmodium* as male-specific gametocytes protein (Schwank et al., 2010; Alonso-Morales et al., 2015). Nevertheless, alpha tubulin II is also expressed by *P. berghei* female gametocyte at low expression level in a ration 6:1 (Kooij et al., 2005) despite it still can be used as sex-specific marker (Khan et al., 2005). In *P. berghei*, alpha tubulin II would be a critical component for exflagellation and cellular motility as component of the axonemal microtubules (Rawlings et al., 1992; Kooij et al., 2005). The high abundance variation observed in Δ kin8 parasites compared to WT parasites could have an explanation on the assorted activities disciplined by microtubules for cellular organization, gene expression and flagellar formation. Besides the post-translational assumptive importance to alpha and beta tubulins for microtubule stability and interactions to

others proteins (Kooij et al., 2005), the dynamic of tubulin isoforms might have an affect on cellular adaptation, stages development and chromatin condensing.

In *P. berghei*, actin-1 and actin-2 are expressed in gametocytes but actin-2 is solely expressed in male gametocytes (Wesseling et al., 1989;Alonso-Morales et al., 2015) although its function needs to be further investigated for a better understanding of its role in male gamete development (Deligianni et al., 2011;Alonso-Morales et al., 2015). From our findings (shown in Table 1, Table 2), actin 2 does not have significant abundance variation between WT parasites and Δ kin8 parasites, and that could be an indicative that actin 2 has no relationship to effects and co-effects triggered by kin8.

The fact that disruption of kin8 affects directly two microtubule-related gametogenesis processes: nuclei individualization and axoneme formation, could be explain in part by the small number of kinesins present in *Plasmodium* genome suggesting that one kinesin protein could participate in more than one process within the parasite. Deficiency in kin8 does not seem to represent a great interference to *P. berghei* morphology at the beginning of the gametogenesis process and DNA replication occurs. However, both parasite lines are likely to be departing from gametocyte physiologic condition under different metabolically state and protein content that end to a dissimilar structural organization. The differential phosphorylation of several proteins in both parasite lines during the gametogenesis have certainly also importance in regulating their functions during the cell process, but further studies are required to demonstrate their role in this process.

In summary, with kin8 disruption, we observed 2 main phenotypic and functional defects in chromatin organisation/nuclei individualisation and axoneme assembly (Figure 5). At the proteotype level, we observed important synthesis and phosphorylation modulations of proteins. The nuclear division disorganisation could be related to the down-expression of nucleosome unit, up-expression of protein involved in the replication. In parallel, we observed clearly a high expression of the ubiquitin-dependant proteasome complex and proteins of stress response and folding and low expression of some proteins involved in energy metabolism and egress from RBC. In the other side, the axoneme disorganisation and mitotic spindle microtubules probably correspond to the down-regulation of motor proteins like kinesin 13, dynein heavy chain and obviously the disrupted kin8 and the up-regulation of proteins involved in the improperly inner arm and radial spoke organization, and the tubulins as well. This overview could explain the slower growth of the

male mutant, the non-differentiation and non-exflagellation and consequently the non-formation of microgamete, represented as a scheme in the figure 5.

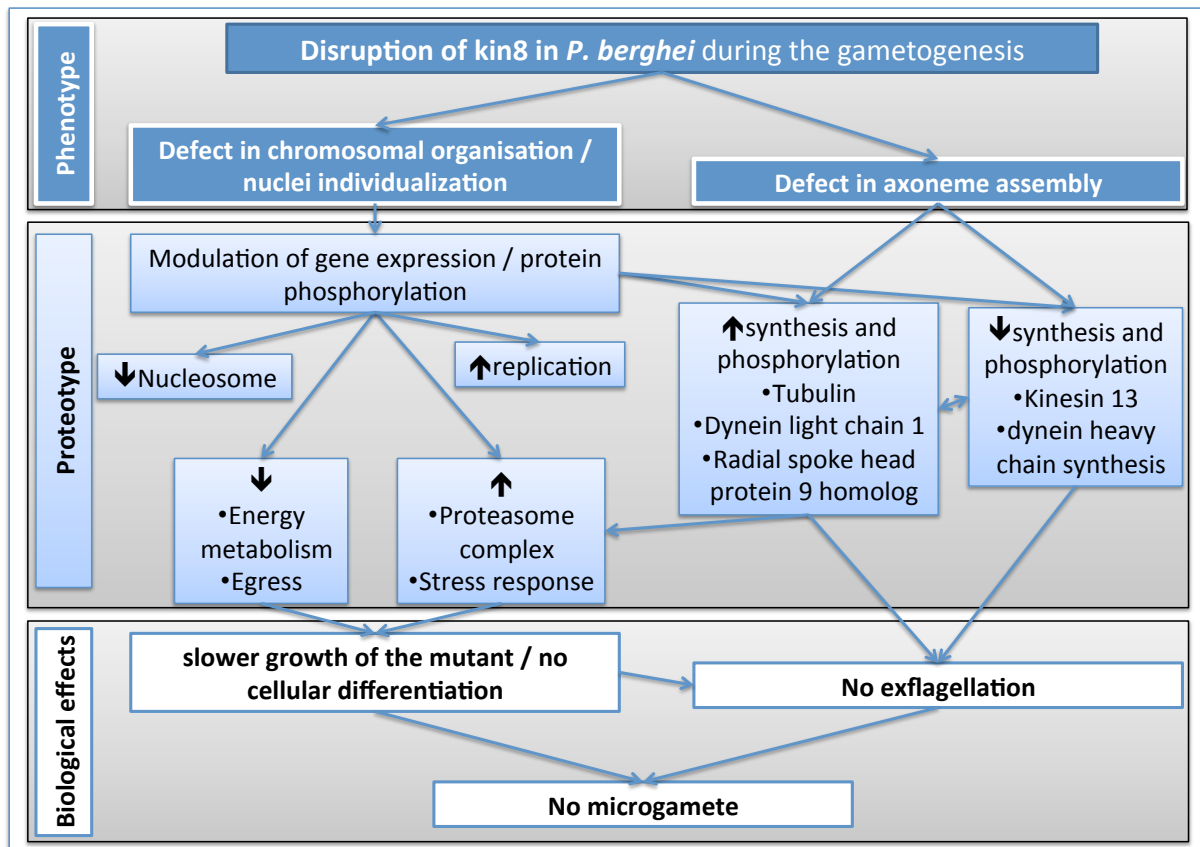


Figure 5. Scheme of the proposed connexion between phenotype and proteotype related to the biological effects in the $\Delta kin8$ *P. berghei*. ↓: decrease; ↑: increase.

SUPPLEMENTARY DATA

Suppl. Table S1. Δ kin8 *P. berghei* proteins identified during gametogenesis.

Accession number	#Unique Peptides	MW	Sequence Count	Spectrum Count	Coverage	Description
PBANKA_071190	68	75155	81	597	0.6724	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70 (HSP70) protein length=693
PBANKA_120690	53	49739.9	55	539	0.8539	Plasmodium berghei ANKA tubulin beta chain, putative protein length=445
PBANKA_121430	56	48977.4	58	447	0.8879	Plasmodium berghei ANKA enolase, putative (ENO) protein length=446
PBANKA_132640	50	36541	50	355	0.9585	Plasmodium berghei ANKA glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, putative (GAPDH) protein length=337
PBANKA_113330	5	48909.9	44	331	0.6749	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443
PBANKA_081890	26	72084.9	52	329	0.5561	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70, putative protein length=651
PBANKA_113340	0	48909.9	39	325	0.6749	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443
PBANKA_070280	50	55358.1	50	297	0.6432	Plasmodium berghei ANKA protein disulfide isomerase protein length=482
PBANKA_052270	12	49669.3	30	225	0.5911	Plasmodium berghei ANKA alpha tubulin 2 protein length=450
PBANKA_111860	37	90764.2	38	212	0.4945	Plasmodium berghei ANKA cell division cycle protein 48 homologue, putative protein length=815
PBANKA_020300	31	50481.8	31	194	0.6256	Plasmodium berghei ANKA chromatin assembly factor 1 protein WD40 domain, putative protein length=446
PBANKA_131480	48	93297.2	51	186	0.5192	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 2, putative protein length=832
PBANKA_130860	38	39808.9	38	173	0.8672	Plasmodium berghei ANKA fructose-bisphosphate aldolase 2 (ALDO2) protein length=369
PBANKA_130130	27	39026.9	27	164	0.7329	Plasmodium berghei ANKA trailer hitch homolog, putative (CITH) protein length=337
PBANKA_041770	9	50156.3	26	149	0.5453	Plasmodium berghei ANKA alpha tubulin 1 protein length=453
PBANKA_112560	34	55493.8	34	142	0.7280	Plasmodium berghei ANKA pyruvate kinase, putative protein length=511
PBANKA_134040	26	36916.3	26	140	0.6048	Plasmodium berghei ANKA oxidoreductase, putative protein length=334
PBANKA_080570	42	83143.2	43	136	0.4986	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 90, putative (HSP90) protein length=720
PBANKA_082340	27	45448.1	27	136	0.6274	Plasmodium berghei ANKA phosphoglycerate kinase, putative (PGK) protein length=416
PBANKA_134010	29	34384.1	29	129	0.7690	Plasmodium berghei ANKA L-lactate dehydrogenase (LDH) protein length=316
PBANKA_145930	24	41840	28	126	0.6755	Plasmodium berghei ANKA actin I protein length=376
PBANKA_142330	20	26845.5	20	121	0.4876	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 1, putative (ALBA1) protein length=242
PBANKA_143220	22	24252.8	22	116	0.6308	Plasmodium berghei ANKA male development gene 1 (MDV1) protein length=214
PBANKA_071260	28	30166.7	31	115	0.7748	Plasmodium berghei ANKA 14-3-3 protein (14-3-31) protein length=262
PBANKA_143920	30	93239.1	30	115	0.4568	Plasmodium berghei ANKA polyadenylate-binding protein, putative (PABP) protein length=834
PBANKA_144900	31	65322.5	31	115	0.5390	Plasmodium berghei ANKA aspartyl protease, putative protein length=577

PBANKA_101670	20	32689.7	20	110	0.5090	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=279
PBANKA_145030	16	57830.3	19	110	0.5441	Plasmodium berghei ANKA ATP synthase subunit beta, mitochondrial, putative protein length=533
PBANKA_121650	13	18788.3	14	104	0.5176	Plasmodium berghei ANKA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative (CYP19A) protein length=170
PBANKA_143730	25	93169.2	25	102	0.3453	Plasmodium berghei ANKA endoplasmic reticulum chaperone protein, putative (GRP94) protein length=808
PBANKA_121930	28	94821.3	28	93	0.2931	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 110, putative (HSP110c) protein length=836
PBANKA_146300	31	309004.2	31	89	0.1474	Plasmodium berghei ANKA osmiophilic body protein (G377) protein length=2606
PBANKA_111340	21	85042.1	21	88	0.2899	Plasmodium berghei ANKA secreted ookinete protein, putative,6-cysteine protein (PSOP12) protein length=721
PBANKA_103440	14	50432.6	14	84	0.2978	Plasmodium berghei ANKA plasmepsin IV (PM4) protein length=450
PBANKA_121400	25	62189.5	25	76	0.4421	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 60, putative protein length=579
PBANKA_081990	18	31650.8	18	70	0.4532	Plasmodium berghei ANKA nucleosome assembly protein (NAPS) protein length=267
PBANKA_121470	27	111954.5	27	70	0.2976	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=961
PBANKA_040520	15	59033.4	15	69	0.3640	Plasmodium berghei ANKA T-complex protein beta subunit, putative protein length=533
PBANKA_135510	14	35429.9	14	69	0.3194	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S6, putative protein length=310
PBANKA_136030	13	42121.4	13	64	0.2380	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 4, putative (ALBA4) protein length=374
PBANKA_092810	12	28671.1	12	62	0.3040	Plasmodium berghei ANKA phosphoglycerate mutase, putative (PGM1) protein length=250
PBANKA_114170	3	14589.9	12	62	0.4688	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-60S ribosomal protein L40, putative protein length=128
PBANKA_111700	7	14194.8	8	61	0.6316	Plasmodium berghei ANKA histone H2A, putative (H2A) protein length=133
PBANKA_070470	17	57214.4	17	60	0.3368	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=487
PBANKA_093420	9	41217.1	9	59	0.5867	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin domain-containing protein DSK2, putative (DSK2) protein length=375
PBANKA_061030	0	25685.8	9	57	0.2620	Plasmodium berghei ANKA polyubiquitin, putative protein length=229
PBANKA_093840	18	39080.3	18	57	0.6199	Plasmodium berghei ANKA endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein, putative protein length=342
PBANKA_061920	14	54662.5	14	56	0.2839	Plasmodium berghei ANKA secreted ookinete protein, putative (PSOP1) protein length=479
PBANKA_093030	12	24852.8	12	56	0.5327	Plasmodium berghei ANKA GTP-binding nuclear protein RAN/TC4, putative protein length=214
PBANKA_133190	14	45322.5	14	56	0.3141	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic initiation factor 4a, putative (eIF4A) protein length=398
PBANKA_061160	22	96972	22	55	0.2963	Plasmodium berghei ANKA ribonucleoside-diphosphate reductase, large subunit, putative protein length=847
PBANKA_111770	15	34273.8	15	52	0.5495	Plasmodium berghei ANKA malate dehydrogenase, putative (MDH) protein length=313
PBANKA_050580	9	29223.5	9	51	0.4962	Plasmodium berghei ANKA deoxyribose-phosphate aldolase, putative protein length=262
PBANKA_093220	12	21179.1	12	51	0.5677	Plasmodium berghei ANKA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative protein length=192
PBANKA_121770	11	49325.6	11	51	0.2771	Plasmodium berghei ANKA ATP-dependent RNA helicase DDX6 (DOZI) protein length=433

PBANKA_142690	20	104135.3	20	48	0.2585	Plasmodium berghei ANKA RNA helicase, putative protein length=909
PBANKA_083300	8	19236.1	8	47	0.4713	Plasmodium berghei ANKA profilin, putative (PFN) protein length=174
PBANKA_060430	16	38739.5	16	46	0.5000	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=330
PBANKA_130070	19	183560.8	19	46	0.1802	Plasmodium berghei ANKA LCCL domain-containing protein (CCp1) protein length=1615
PBANKA_110670	18	46085.3	18	45	0.3528	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L4, putative (RPL4) protein length=411
PBANKA_091440	15	73103.1	15	44	0.1795	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70, putative (UIS24) protein length=663
PBANKA_091620	11	60078.6	11	44	0.3039	Plasmodium berghei ANKA TCP-1/cpn60 chaperonin family, putative protein length=543
PBANKA_130280	12	21622.3	12	44	0.4769	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin peroxidase 1 (TPx1) protein length=195
PBANKA_111300	15	26971.7	15	43	0.7008	Plasmodium berghei ANKA purine nucleoside phosphorylase, putative (PNP) protein length=244
PBANKA_100380	14	55775.4	14	42	0.4494	Plasmodium berghei ANKA vacuolar ATP synthase subunit b, putative protein length=494
PBANKA_111520	17	132736.1	17	42	0.1722	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1138
PBANKA_142430	12	32548.1	12	41	0.3521	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=284
PBANKA_082670	6	25218.7	6	39	0.2748	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=222
PBANKA_141030	14	123256.3	14	39	0.1814	Plasmodium berghei ANKA M1-family alanyl aminopeptidase, putative protein length=1064
PBANKA_120440	8	11965.3	8	38	0.6916	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 3, putative (ALBA3) protein length=107
PBANKA_094180	9	13231.2	9	37	0.5254	Plasmodium berghei ANKA histone H2B, putative (H2B) protein length=118
PBANKA_101950	9	33843.2	9	36	0.3208	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L5, putative protein length=293
PBANKA_130380	13	27807.4	13	36	0.4032	Plasmodium berghei ANKA triosephosphate isomerase, putative (TIM) protein length=248
PBANKA_091790	8	50927.3	10	35	0.3370	Plasmodium berghei ANKA 26S protease regulatory subunit 6a, putative (RPT5) protein length=451
PBANKA_103390	10	24959.3	10	35	0.3349	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S8e, putative protein length=218
PBANKA_141040	11	68289.2	11	34	0.2930	Plasmodium berghei ANKA vacuolar ATP synthase subunit a, putative protein length=611
PBANKA_092130	8	19697.1	8	33	0.5429	Plasmodium berghei ANKA deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, putative protein length=175
PBANKA_103270	14	58837.1	14	33	0.3629	Plasmodium berghei ANKA RNA binding protein Bruno, putative (HoBo) protein length=507
PBANKA_123100	6	16046.7	6	33	0.3046	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S11, putative protein length=151
PBANKA_021150	8	28311.4	8	32	0.4531	Plasmodium berghei ANKA proteasome subunit alpha type-5, putative protein length=256
PBANKA_060320	10	17524.7	10	31	0.6522	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 5A, putative (EIF5A) protein length=161
PBANKA_113790	8	30637.6	9	31	0.3796	Plasmodium berghei ANKA proliferating cell nuclear antigen, putative (PCNA) protein length=274
PBANKA_131080	10	29901.8	10	31	0.5314	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S5, putative protein length=271
PBANKA_145780	14	33119.2	14	31	0.5574	Plasmodium berghei ANKA ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, putative (ARFGAP) protein length=296
PBANKA_020450	9	121466.2	9	30	0.1087	Plasmodium berghei ANKA LCCL domain-containing protein (CCp5) protein length=1049

PBANKA_142350	12	25385	12	30	0.3721	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L13-2, putative protein length=215
PBANKA_145610	5	16049.7	5	30	0.3212	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S17, putative protein length=137
PBANKA_093110	8	24745.5	8	29	0.5160	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=219
PBANKA_103520	13	148090.1	13	29	0.1281	Plasmodium berghei ANKA LCCL domain-containing protein (CCp3) protein length=1304
PBANKA_113570	6	57133.8	6	29	0.2603	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=511
PBANKA_121560	9	29947.3	9	29	0.1527	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S3A, putative protein length=262
PBANKA_030130	8	9784.8	8	28	0.3407	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=91
PBANKA_040540	10	15434	10	28	0.4859	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S12, putative protein length=142
PBANKA_052280	5	19994.8	5	28	0.2442	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S19, putative (RPS19) protein length=172
PBANKA_090360	8	93443.4	8	28	0.1511	Plasmodium berghei ANKA dynamin-like protein, putative (DYN1) protein length=814
PBANKA_141910	8	47783.5	8	28	0.2861	Plasmodium berghei ANKA dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, putative protein length=423
PBANKA_143105	6	10972.9	6	28	0.4510	Plasmodium berghei ANKA 10 kDa chaperonin, putative (CPN10) protein length=102
PBANKA_081420	10	29995.1	10	27	0.3424	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-beta, putative protein length=257
PBANKA_132090	7	11612.9	7	27	0.5385	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin 1, putative (TRX1) protein length=104
PBANKA_132500	6	7487.1	6	27	0.5075	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S28e, putative protein length=67
PBANKA_140130	4	22449.6	4	27	0.2835	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S7, putative protein length=194
PBANKA_120720	8	27364.5	8	26	0.3802	Plasmodium berghei ANKA adenylate kinase, putative (AK1) protein length=242
PBANKA_101940	6	33244.8	6	25	0.2148	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L7-3, putative protein length=284
PBANKA_123880	8	127725.3	8	25	0.1083	Plasmodium berghei ANKA karyopherin beta, putative protein length=1126
PBANKA_135440	7	21668.5	7	25	0.1957	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L18, putative protein length=184
PBANKA_144410	10	60779	10	25	0.1993	Plasmodium berghei ANKA t-complex protein 1 gamma subunit, putative protein length=542
PBANKA_121760	0	16465.4	2	24	0.1456	Plasmodium berghei ANKA histone H2A variant, putative (H2A.Z) protein length=158
PBANKA_120500	7	27807.9	7	23	0.1845	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=233
PBANKA_121090	5	68099	5	23	0.0776	Plasmodium berghei ANKA phosphoglucomutase, putative protein length=593
PBANKA_135970	6	48879.1	6	23	0.1323	Plasmodium berghei ANKA 6-cysteine protein (P47) protein length=431
PBANKA_070390	7	35542.9	7	22	0.1925	Plasmodium berghei ANKA receptor for activated c kinase, putative (RACK) protein length=322
PBANKA_083100	11	198529.4	11	22	0.1072	Plasmodium berghei ANKA merozoite surface protein 1 (MSP1) protein length=1791
PBANKA_093770	7	12700.3	7	22	0.3805	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L36, putative (RPL36) protein length=113
PBANKA_101850	8	19905.6	8	22	0.3966	Plasmodium berghei ANKA transcription factor 3b, putative protein length=174
PBANKA_124230	7	47637.9	7	22	0.1797	Plasmodium berghei ANKA Hsc70-interacting protein,58 kDa phosphoprotein (HIP) protein length=423

PBANKA_135860	7	53688.7	7	22	0.1450	Plasmodium berghei ANKA isocitrate dehydrogenase (NADP), mitochondrial precursor, putative (IDH) protein length=469
PBANKA_145020	8	49575.4	8	22	0.2104	Plasmodium berghei ANKA serine hydroxymethyltransferase, putative (SHMT) protein length=442
PBANKA_020160	5	18642.4	5	21	0.4463	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein (ETRAMP) protein length=177
PBANKA_030680	7	52978.9	7	21	0.1974	Plasmodium berghei ANKA ATP-dependent RNA helicase UAP56, putative (UAP56) protein length=466
PBANKA_040760	9	66318.9	9	21	0.1670	Plasmodium berghei ANKA asparagine synthetase, putative protein length=581
PBANKA_051190	8	44319.8	8	21	0.2383	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L3, putative (RPL3) protein length=386
PBANKA_101050	10	65585.2	10	21	0.1878	Plasmodium berghei ANKA Hsp70/Hsp90 organizing protein, putative (HOP) protein length=559
PBANKA_094360	4	12871.5	4	20	0.5042	Plasmodium berghei ANKA 60S acidic ribosomal protein P1, putative protein length=119
PBANKA_100950	10	336064.3	10	20	0.0655	Plasmodium berghei ANKA NAD(P)H-dependent glutamate synthase, putative protein length=2962
PBANKA_123210	6	36233.1	6	20	0.1365	Plasmodium berghei ANKA pre-mRNA-splicing factor, putative (SR1) protein length=315
PBANKA_133830	3	21614.9	3	20	0.2895	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L6, putative protein length=190
PBANKA_040650	8	59569.9	8	19	0.2282	Plasmodium berghei ANKA TCP-1/cpn60 chaperonin, putative protein length=539
PBANKA_040770	8	11778.8	8	19	0.5045	Plasmodium berghei ANKA 60S acidic ribosomal protein P2, putative protein length=111
PBANKA_091800	11	34820.2	11	19	0.4952	Plasmodium berghei ANKA 60S acidic ribosomal protein P0, putative protein length=315
PBANKA_051280	9	66720.1	9	18	0.0631	Plasmodium berghei ANKA merozoite TRAP-like protein, putative (MTRAP) protein length=618
PBANKA_060270	6	40275.8	6	18	0.1710	Plasmodium berghei ANKA nucleosome assembly protein, putative (NAPL) protein length=345
PBANKA_093850	7	35487.3	7	18	0.2705	Plasmodium berghei ANKA succinyl-CoA synthetase alpha subunit, putative protein length=329
PBANKA_111750	6	16808.1	6	18	0.4054	Plasmodium berghei ANKA ribosomal protein L27a, putative protein length=148
PBANKA_113780	6	291206.2	6	18	0.0330	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=2605
PBANKA_123170	10	27855.1	10	18	0.2692	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L2, putative (RPL2) protein length=260
PBANKA_132930	6	24702.5	6	18	0.2838	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S3, putative protein length=222
PBANKA_040470	6	12361.4	6	17	0.6514	Plasmodium berghei ANKA glutaredoxin 1, putative (GRX1) protein length=109
PBANKA_040840	8	126079.8	8	17	0.0889	Plasmodium berghei ANKA phosphoglycerate mutase, putative protein length=1069
PBANKA_060760	3	12067.3	3	17	0.6574	Plasmodium berghei ANKA U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7, putative (LSM7) protein length=108
PBANKA_090500	3	9166.6	3	17	0.1220	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S21, putative (RPS21) protein length=82
PBANKA_091910	8	44649.8	8	17	0.2577	Plasmodium berghei ANKA parasitophorous vacuolar protein 1, putative (PV1) protein length=388
PBANKA_123560	5	53623.2	5	17	0.1420	Plasmodium berghei ANKA adenosylhomocysteinase, putative (SAHH) protein length=479
PBANKA_133840	5	14023.5	5	17	0.4380	Plasmodium berghei ANKA vacuolar ATP synthase subunit g, putative protein length=121
PBANKA_143080	5	24693.7	5	17	0.3907	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin peroxidase 2, putative (Trx-Px2) protein length=215

PBANKA_144330	8	69548.5	8	17	0.1667	Plasmodium berghei ANKA merozoite surface protein 9, putative protein length=618
PBANKA_030510	9	154804.4	9	16	0.1238	Plasmodium berghei ANKA serine repeat antigen 1 (SERA1) protein length=1406
PBANKA_082170	6	55844.6	6	16	0.1183	Plasmodium berghei ANKA inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, putative protein length=507
PBANKA_101000	7	28870.9	7	16	0.2540	Plasmodium berghei ANKA mitochondrial acidic protein MAM33, putative protein length=252
PBANKA_112620	7	20675.9	7	16	0.5026	Plasmodium berghei ANKA protein DJ-1, putative (DJ1) protein length=189
PBANKA_114580	5	20338.1	5	16	0.2514	Plasmodium berghei ANKA conserved rodent malaria protein, unknown function protein length=179
PBANKA_031000	5	38079.2	5	15	0.1228	Plasmodium berghei ANKA heat shock 40 kDa protein, putative protein length=334
PBANKA_051360	5	41944.6	5	15	0.0744	Plasmodium berghei ANKA adenosine deaminase, putative (ADA) protein length=363
PBANKA_092670	5	17914.5	5	15	0.4277	Plasmodium berghei ANKA exported protein 1, putative, circumsporozoite-related antigen (EXP1) protein length=166
PBANKA_103010	4	42609.2	6	15	0.1888	Plasmodium berghei ANKA actin II protein length=376
PBANKA_111540	4	9689.2	4	15	0.4048	Plasmodium berghei ANKA BolA-like protein, putative protein length=84
PBANKA_112290	8	55405.6	8	15	0.1660	Plasmodium berghei ANKA hexokinase, putative (HK) protein length=494
PBANKA_121080	5	26490.3	5	15	0.1602	Plasmodium berghei ANKA hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative (HGPR1) protein length=231
PBANKA_124180	8	107214.3	8	15	0.0624	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM3, putative (MCM3) protein length=945
PBANKA_136290	9	67091.5	9	15	0.1574	Plasmodium berghei ANKA lysine--tRNA ligase, putative (KRS1) protein length=578
PBANKA_141630	4	16847.3	4	15	0.2828	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S19, putative (RPS19) protein length=145
PBANKA_030500	5	123889.8	5	14	0.0900	Plasmodium berghei ANKA serine repeat antigen 2 (SERA2) protein length=1122
PBANKA_041460	3	14900.1	3	14	0.2769	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S15A, putative protein length=130
PBANKA_050360	4	11787.1	4	14	0.2407	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L30e, putative protein length=108
PBANKA_061090	9	48368.5	9	14	0.3019	Plasmodium berghei ANKA HSP40, subfamily A, putative protein length=424
PBANKA_081640	9	146654.8	9	14	0.1347	Plasmodium berghei ANKA 6-phosphofructokinase, putative (PFK9) protein length=1299
PBANKA_093130	7	78627.4	7	14	0.1557	Plasmodium berghei ANKA dipeptidyl aminopeptidase 1, putative (DPAP1) protein length=681
PBANKA_094250	7	49016.5	7	14	0.2024	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=420
PBANKA_100060	5	38018.4	5	14	0.1799	Plasmodium berghei ANKA erythrocyte membrane antigen 1 protein length=339
PBANKA_114480	3	42374	3	14	0.1828	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=361
PBANKA_114590	4	31722.2	4	14	0.1187	Plasmodium berghei ANKA conserved rodent malaria protein, unknown function protein length=278
PBANKA_121890	3	17629.9	3	14	0.1975	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1 (EF-1), putative protein length=157
PBANKA_140260	7	102620	7	14	0.0991	Plasmodium berghei ANKA DNA ligase I, putative protein length=898
PBANKA_142750	2	10275.1	2	14	0.1818	Plasmodium berghei ANKA acyl-CoA binding protein, putative protein length=88

PBANKA_145070	7	45627.5	7	14	0.3174	Plasmodium berghei ANKA clustered-asparagine-rich protein, putative protein length=397
PBANKA_020930	2	42993.9	2	13	0.1094	Plasmodium berghei ANKA actin-related protein (ARP1) protein length=384
PBANKA_060190	4	12379.5	4	13	0.2381	Plasmodium berghei ANKA high mobility group protein B1, putative (HMGB1) protein length=105
PBANKA_091230	6	117761.9	6	13	0.0800	Plasmodium berghei ANKA tudor staphylococcal nuclease, putative (TSN) protein length=1013
PBANKA_092440	2	15371.1	2	13	0.3901	Plasmodium berghei ANKA splicing factor, putative protein length=141
PBANKA_094150	3	29807.4	3	13	0.1111	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S4, putative protein length=261
PBANKA_113700	9	133431.5	9	13	0.0975	Plasmodium berghei ANKA bergheilysin (BLN) protein length=1149
PBANKA_120190	2	13486.2	2	13	0.1356	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S20e, putative protein length=118
PBANKA_121820	6	59128.2	6	13	0.0953	Plasmodium berghei ANKA T-complex protein 1 epsilon subunit, putative protein length=535
PBANKA_130620	2	46126.4	2	13	0.0844	Plasmodium berghei ANKA tRNA binding protein, putative protein length=403
PBANKA_131810	6	89819.7	6	13	0.0992	Plasmodium berghei ANKA aminopeptidase P, putative (APP) protein length=776
PBANKA_142270	4	22536.2	4	13	0.3586	Plasmodium berghei ANKA superoxide dismutase [Fe], putative (FeSOD) protein length=198
PBANKA_040530	3	16087.9	3	12	0.2483	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S23, putative protein length=145
PBANKA_041820	5	23684.9	5	12	0.1699	Plasmodium berghei ANKA ras-related protein RAB7, putative (RAB7) protein length=206
PBANKA_092210	5	17852.7	6	12	0.4487	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S18, putative protein length=156
PBANKA_093390	2	41780.4	2	12	0.1530	Plasmodium berghei ANKA glyoxalase I, putative protein length=353
PBANKA_100880	7	68014.1	7	12	0.1297	Plasmodium berghei ANKA glucose-6-phosphate isomerase, putative protein length=586
PBANKA_113510	7	17228.6	7	12	0.4305	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S15, putative (RPS15) protein length=151
PBANKA_121850	5	16636.2	5	12	0.3194	Plasmodium berghei ANKA protein phosphatase inhibitor 2, putative protein length=144
PBANKA_123220	3	127467.2	3	12	0.0511	Plasmodium berghei ANKA FACT complex subunit SPT16 (FACT-L) protein length=1096
PBANKA_136420	5	22820.7	5	12	0.2475	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L17, putative protein length=198
PBANKA_140490	4	44674.5	4	12	0.1527	Plasmodium berghei ANKA 26S protease regulatory subunit 10B, putative (RPT4) protein length=393
PBANKA_143520	3	55729.8	3	12	0.1104	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=480
PBANKA_010080	6	157332.9	6	11	0.0695	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1382
PBANKA_010710	4	26410.5	4	11	0.0894	Plasmodium berghei ANKA proteasome subunit alpha type-2, putative protein length=235
PBANKA_030490	5	123106.3	5	11	0.0794	Plasmodium berghei ANKA serine repeat antigen 3 (SERA3) protein length=1096
PBANKA_071550	2	34928.2	2	11	0.1007	Plasmodium berghei ANKA phosphoglucomutase-2 (PGM2) protein length=298
PBANKA_082300	5	161341.7	5	11	0.0831	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-like protein, putative protein length=1384
PBANKA_090640	2	16455	2	11	0.1748	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L35ae, putative protein length=143
PBANKA_093960	6	368279.4	6	11	0.0264	Plasmodium berghei ANKA polyadenylate-binding protein-interacting protein 1, putative (PAIP1) protein length=3296

PBANKA_110220	5	46689.2	5	11	0.1394	Plasmodium berghei ANKA merozoite surface protein 8 (MSP8) protein length=409
PBANKA_110540	3	10817.3	3	11	0.1212	Plasmodium berghei ANKA small ubiquitin-related modifier, putative (SUMO) protein length=99
PBANKA_120660	3	49660.3	3	11	0.0895	Plasmodium berghei ANKA 26S protease regulatory subunit 4, putative protein length=447
PBANKA_122800	3	25359.9	3	11	0.1682	Plasmodium berghei ANKA 1-cys peroxiredoxin, putative protein length=220
PBANKA_123180	5	18184.7	5	11	0.3455	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L12, putative protein length=165
PBANKA_123480	5	22114.2	5	11	0.2857	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S9, putative protein length=189
PBANKA_136550	4	37365.3	4	11	0.0887	Plasmodium berghei ANKA intra-erythrocytic P. berghei-induced structures protein 1 (IBIS1) protein length=327
PBANKA_140960	5	59450.3	5	11	0.0971	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=484
PBANKA_010070	3	36115.2	3	10	0.1900	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=321
PBANKA_031380	6	61305.4	6	10	0.1259	Plasmodium berghei ANKA ATP synthase F1, alpha subunit, putative protein length=548
PBANKA_040480	6	71075.5	6	10	0.1260	Plasmodium berghei ANKA FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, putative protein length=627
PBANKA_052420	3	16719.9	3	10	0.1613	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein,small exported protein (SEP2) protein length=155
PBANKA_061910	3	21711.4	3	10	0.1959	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S5, putative protein length=194
PBANKA_094190	4	11430.4	4	10	0.4078	Plasmodium berghei ANKA histone H4, putative protein length=103
PBANKA_102840	5	25212.2	5	10	0.2603	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L10, putative protein length=219
PBANKA_124190	5	17176	5	10	0.5099	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-conjugating enzyme E2 N, putative (UBC13) protein length=151
PBANKA_131040	3	19338.5	3	10	0.3155	Plasmodium berghei ANKA centrin-2, putative (CEN2) protein length=168
PBANKA_131270	3	28760.4	3	10	0.1205	Plasmodium berghei ANKA gamete egress and sporozoite traversal protein (GEST) protein length=249
PBANKA_133860	4	20660.5	4	10	0.1602	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L23, putative (RPL23) protein length=181
PBANKA_135190	3	26708.1	3	10	0.2381	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L6-2, putative protein length=231
PBANKA_031100	3	156519.8	3	9	0.0252	Plasmodium berghei ANKA protein transport protein SEC31, putative (SEC31) protein length=1388
PBANKA_050510	4	20830.8	4	9	0.2652	Plasmodium berghei ANKA ADP-ribosylation factor, putative (ARF1) protein length=181
PBANKA_061020	5	85475.5	5	9	0.1029	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM5, putative (MCM5) protein length=758
PBANKA_071740	1	25217.8	1	9	0.1233	Plasmodium berghei ANKA coatomer subunit zeta, putative protein length=219
PBANKA_072170	3	32042.1	3	9	0.1617	Plasmodium berghei ANKA ran binding protein 1, putative protein length=266
PBANKA_082470	3	71336.9	3	9	0.0639	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin reductase, putative (TRXR) protein length=642
PBANKA_090650	5	14555	5	9	0.3095	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L28, putative protein length=126
PBANKA_090880	3	36997.4	3	9	0.1238	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=315
PBANKA_101320	6	51484.5	6	9	0.1681	Plasmodium berghei ANKA ATP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit, putative protein length=458

PBANKA_111050	3	19843.7	3	9	0.2573	Plasmodium berghei ANKA translationally-controlled tumor protein homolog, putative (TCTP) protein length=171
PBANKA_113720	3	106346.6	3	9	0.0594	Plasmodium berghei ANKA protein transport protein Sec24A, putative (SEC24A) protein length=942
PBANKA_122900	7	126199.2	7	9	0.0804	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=1095
PBANKA_123450	2	22469.7	2	9	0.1047	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=191
PBANKA_130990	5	72029.8	5	9	0.0598	Plasmodium berghei ANKA M17 leucyl aminopeptidase, putative protein length=635
PBANKA_134030	4	48167	4	9	0.1023	Plasmodium berghei ANKA phosphoribosylpyrophosphate synthetase, putative protein length=430
PBANKA_134330	4	29774.2	4	9	0.0926	Plasmodium berghei ANKA proteasome subunit beta type-7, putative protein length=270
PBANKA_135720	5	106076.6	5	9	0.0632	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 110, putative (HSP110) protein length=917
PBANKA_020630	4	19572.8	4	8	0.4405	Plasmodium berghei ANKA centrin-1, putative (CEN1) protein length=168
PBANKA_051400	1	14892.4	1	8	0.1679	Plasmodium berghei ANKA transcription elongation factor SPT4, putative (SPT4) protein length=131
PBANKA_061540	7	61773.3	7	8	0.1082	Plasmodium berghei ANKA serine--tRNA ligase, putative protein length=536
PBANKA_061990	3	45274.4	3	8	0.1349	Plasmodium berghei ANKA GTP-binding protein, putative protein length=393
PBANKA_081050	3	15508.3	3	8	0.1908	Plasmodium berghei ANKA apoptosis-related protein, putative (ARP) protein length=131
PBANKA_092000	3	15597.6	3	8	0.2426	Plasmodium berghei ANKA multiprotein bridging factor type 1, putative protein length=136
PBANKA_101860	3	18683.1	3	8	0.1677	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L21, putative (RPL21) protein length=161
PBANKA_120240	4	23734.3	4	8	0.1782	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L13, putative protein length=202
PBANKA_121360	4	78310.1	4	8	0.0554	Plasmodium berghei ANKA cysteine--tRNA ligase, putative (CysRS) protein length=668
PBANKA_132810	3	44527.4	3	8	0.0654	Plasmodium berghei ANKA ATP synthase (C/AC39) subunit, putative protein length=382
PBANKA_135920	5	23532	5	8	0.2921	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 2, putative (ALBA2) protein length=202
PBANKA_140680	2	9176.6	2	8	0.1585	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S27, putative (RPS27) protein length=82
PBANKA_141000	6	46769.1	6	8	0.1762	Plasmodium berghei ANKA 26S protease regulatory subunit 7, putative (RPT1) protein length=420
PBANKA_142420	1	77278.8	1	8	0.0212	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=661
PBANKA_145510	2	37629.5	2	8	0.1101	Plasmodium berghei ANKA replication factor C subunit 4, putative protein length=336
PBANKA_010330	5	234947.2	5	7	0.0482	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=2033
PBANKA_010740	4	46275.8	4	7	0.1208	Plasmodium berghei ANKA ornithine aminotransferase, putative (OAT) protein length=414
PBANKA_020134	2	12965.4	2	7	0.1101	Plasmodium berghei ANKA fam-c protein protein length=109
PBANKA_020700	2	127254	3	7	0.0330	Plasmodium berghei ANKA calcium-transporting ATPase, putative (SERCA) protein length=1120
PBANKA_031090	4	60751.7	4	7	0.1031	Plasmodium berghei ANKA T-complex protein 1, putative protein length=543
PBANKA_051870	5	104617	5	7	0.0601	Plasmodium berghei ANKA methionine--tRNA ligase, putative protein length=898
PBANKA_051990	5	180209.2	5	7	0.0999	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1591

PBANKA_061040	5	165465.4	5	7	0.0306	Plasmodium berghei ANKA ATPase, putative protein length=1472
PBANKA_061450	4	37171.6	4	7	0.1376	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor subunit, putative protein length=327
PBANKA_081300	2	39931.8	2	7	0.1243	Plasmodium berghei ANKA inhibitor of cysteine proteases (ICP) protein length=354
PBANKA_092080	4	35198.9	4	7	0.1438	Plasmodium berghei ANKA CRAL/TRIO domain-containing protein, putative protein length=299
PBANKA_092490	2	59918.8	2	7	0.0940	Plasmodium berghei ANKA translation elongation factor EF-1, subunit alpha, putative protein length=532
PBANKA_102200	2	11770.6	2	7	0.2286	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S25, putative protein length=105
PBANKA_102230	2	47030.7	2	7	0.0725	Plasmodium berghei ANKA mannose-1-phosphate guanyltransferase, putative protein length=414
PBANKA_103190	2	51212.1	2	7	0.0860	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit, putative protein length=465
PBANKA_110310	2	13937	2	7	0.1803	Plasmodium berghei ANKA actin-depolymerizing factor 1 (ADF1) protein length=122
PBANKA_112770	2	79447.3	2	7	0.0552	Plasmodium berghei ANKA nicotinate phosphoribosyltransferase, putative (NAPRT) protein length=689
PBANKA_114240	4	17094.9	4	7	0.1678	Plasmodium berghei ANKA nucleoside diphosphate kinase b, putative protein length=149
PBANKA_114400	2	35112.1	2	7	0.0868	Plasmodium berghei ANKA 26S proteasome regulatory subunit RPN11, putative (RPN11) protein length=311
PBANKA_124440	5	9931.8	5	7	0.1512	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=86
PBANKA_130510	1	24785.8	1	7	0.0783	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L10a, putative protein length=217
PBANKA_135450	4	21492.1	4	7	0.2246	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L18-2, putative protein length=187
PBANKA_143800	4	49622.8	4	7	0.1101	Plasmodium berghei ANKA CAMP-dependent protein kinase regulatory subunit, putative (PKAr) protein length=436
PBANKA_144140	1	30280	2	7	0.0720	Plasmodium berghei ANKA proliferating cell nuclear antigen 2, putative (PCNA2) protein length=264
PBANKA_146180	2	47958.7	2	7	0.1090	Plasmodium berghei ANKA 26S protease regulatory subunit 8, putative (RPT6) protein length=422
PBANKA_031600	2	99152.9	2	6	0.0395	Plasmodium berghei ANKA replication factor C subunit 1, putative protein length=861
PBANKA_050660	2	55599.8	2	6	0.0457	Plasmodium berghei ANKA serine/arginine-rich splicing factor 4, putative (SRSF4) protein length=481
PBANKA_060280	2	16510.5	2	6	0.2041	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative (UBC) protein length=147
PBANKA_091760	2	115942	2	6	0.0304	Plasmodium berghei ANKA structural maintenance of chromosome protein, putative, fragment protein length=986
PBANKA_092820	4	93642.7	4	6	0.0508	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=788
PBANKA_093720.1	1	144166.2	2	6	0.0145	Plasmodium berghei ANKA asparagine-rich antigen, putative protein length=1242
PBANKA_102490	3	111278.7	3	6	0.0608	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM2, putative (MCM2) protein length=971
PBANKA_103800	4	12998.6	4	6	0.2931	Plasmodium berghei ANKA cytochrome c, putative protein length=116
PBANKA_111140	4	69610.4	4	6	0.0972	Plasmodium berghei ANKA inositol-3-phosphate synthase, putative (INO1) protein length=607
PBANKA_111680	4	53288.9	4	6	0.0647	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=448
PBANKA_113050	3	27145.2	3	6	0.2033	Plasmodium berghei ANKA proteasome subunit alpha type-7, putative protein length=241

PBANKA_114280	4	72969.3	4	6	0.1215	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=634
PBANKA_122120	3	18839.7	3	6	0.1524	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L34, putative (RPL34) protein length=164
PBANKA_142870	5	152338.9	5	6	0.0230	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10, putative protein length=1263
PBANKA_145690	3	12813.7	3	6	0.2522	Plasmodium berghei ANKA translation initiation factor SUI1, putative protein length=115
PBANKA_010730	3	61375.9	3	5	0.1639	Plasmodium berghei ANKA chaperone, putative protein length=543
PBANKA_010910	3	75446	3	5	0.0716	Plasmodium berghei ANKA transketolase, putative (TK) protein length=670
PBANKA_030360	1	110614.3	1	5	0.0171	Plasmodium berghei ANKA 26S proteasome regulatory subunit RPN1, putative (RPN1) protein length=993
PBANKA_040230	4	50061.9	4	5	0.0880	Plasmodium berghei ANKA lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, putative (BCKDH-E2) protein length=443
PBANKA_041750	3	15495.6	3	5	0.1298	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L32, putative (RPL32) protein length=131
PBANKA_050130	2	126455.3	2	5	0.0264	Plasmodium berghei ANKA DNA polymerase delta catalytic subunit, putative protein length=1097
PBANKA_052020	3	33765.7	3	5	0.0432	Plasmodium berghei ANKA ADP/ATP transporter on adenylate translocase, putative protein length=301
PBANKA_060710	2	8521.2	2	5	0.2267	Plasmodium berghei ANKA mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM10, putative (TIM10) protein length=75
PBANKA_071290	3	11453.4	3	5	0.4082	Plasmodium berghei ANKA high mobility group protein B2, putative (HMGB2) protein length=98
PBANKA_071910	2	33470	2	5	0.1210	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=281
PBANKA_090560	3	17816.8	3	5	0.2710	Plasmodium berghei ANKA translation initiation factor eIF-1A, putative protein length=155
PBANKA_092230	2	103580.7	2	5	0.0124	Plasmodium berghei ANKA threonine--tRNA ligase, putative (ThrRS) protein length=890
PBANKA_093720.2	0	148412.1	1	5	0.0141	Plasmodium berghei ANKA asparagine-rich antigen, putative protein length=1279
PBANKA_093860	2	39928.8	2	5	0.1045	Plasmodium berghei ANKA casein kinase 2, alpha subunit (CK2alpha) protein length=335
PBANKA_101630	2	42719.1	2	5	0.0477	Plasmodium berghei ANKA proliferation-associated protein 2g4, putative protein length=377
PBANKA_103230	2	85799.8	2	5	0.0384	Plasmodium berghei ANKA cytidine triphosphate synthetase, putative protein length=756
PBANKA_110300	2	38099.9	2	5	0.0599	Plasmodium berghei ANKA serine/arginine-rich splicing factor 12, putative (SRSF12) protein length=317
PBANKA_112430	2	43531.9	2	5	0.1210	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=372
PBANKA_114360	2	141239	2	5	0.0320	Plasmodium berghei ANKA alanine--tRNA ligase, putative (AlaRS) protein length=1218
PBANKA_120900	1	25459.3	1	5	0.0938	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit, putative protein length=224
PBANKA_130140	1	28858.4	1	5	0.0593	Plasmodium berghei ANKA proteasome subunit alpha type-1, putative protein length=253
PBANKA_131840	4	53305.2	4	5	0.0805	Plasmodium berghei ANKA 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, putative protein length=472
PBANKA_132440	5	16835.5	5	5	0.2466	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L27, putative (RPL27) protein length=146
PBANKA_132970	2	137982.7	2	5	0.0254	Plasmodium berghei ANKA 26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative (RPN2) protein length=1219
PBANKA_134430	1	58820.6	1	5	0.0175	Plasmodium berghei ANKA chromatin assembly factor 1 subunit, putative protein length=513

PBANKA_134670	4	14947	4	5	0.2806	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L23, putative protein length=139
PBANKA_135200	3	46737.5	3	5	0.1092	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-gamma, putative protein length=403
PBANKA_136200	4	94055.3	4	5	0.0286	Plasmodium berghei ANKA glutamate--tRNA ligase, putative protein length=803
PBANKA_136520	2	23599.2	2	5	0.0631	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin-related protein, putative protein length=206
PBANKA_140060	2	152048.9	2	5	0.0316	Plasmodium berghei ANKA cytoadherence linked asexual protein, putative protein length=1296
PBANKA_010100	2	30700.2	2	4	0.1107	Plasmodium berghei ANKA MYND finger protein, putative protein length=262
PBANKA_010390	3	81987.8	3	4	0.0653	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=735
PBANKA_030860	2	66393.6	2	4	0.0330	Plasmodium berghei ANKA asparagine--tRNA ligase, putative protein length=575
PBANKA_040550	1	30452.7	1	4	0.0934	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L7, putative protein length=257
PBANKA_041600	3	104988.7	3	4	0.0374	Plasmodium berghei ANKA high molecular weight rhopty protein 3, putative (RhopH3) protein length=908
PBANKA_050430	2	11559.1	2	4	0.1782	Plasmodium berghei ANKA flagellar outer arm dynein-associated protein, putative protein length=101
PBANKA_061710	2	20221.8	2	4	0.1214	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L11a, putative protein length=173
PBANKA_061790	3	74551.6	3	4	0.0519	Plasmodium berghei ANKA ferredoxin reductase-like protein, putative protein length=655
PBANKA_071520	2	31517.1	2	4	0.0706	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor, putative protein length=269
PBANKA_071560	3	45146	3	4	0.1013	Plasmodium berghei ANKA 26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT3, putative protein length=395
PBANKA_071660	2	29402.7	2	4	0.1725	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=255
PBANKA_083000	2	32349.5	2	4	0.1577	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=279
PBANKA_083020	4	159903.9	4	4	0.0281	Plasmodium berghei ANKA high molecular weight rhopty protein 2, putative (RhopH2) protein length=1354
PBANKA_091810	1	9649.7	1	4	0.1358	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L38, putative (RPL38) protein length=81
PBANKA_092990	3	92140.7	3	4	0.0374	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 90, putative protein length=802
PBANKA_100200	3	71228.6	3	4	0.0881	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=613
PBANKA_100850	2	101867.1	2	4	0.0392	Plasmodium berghei ANKA translocon component PTEX150 (PTEX150) protein length=919
PBANKA_100910	4	93964.1	4	4	0.0403	Plasmodium berghei ANKA ataxin-2 like protein, putative protein length=818
PBANKA_101280	2	33259.9	2	4	0.1211	Plasmodium berghei ANKA voltage-dependent anion-selective channel protein, putative protein length=289
PBANKA_101970	2	136787.1	2	4	0.0281	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1176
PBANKA_102340	4	56460.7	4	4	0.0704	Plasmodium berghei ANKA glutathione reductase, putative (GR) protein length=497
PBANKA_103060	4	38734	4	4	0.0518	Plasmodium berghei ANKA p1/s1 nuclease, putative protein length=328
PBANKA_103210	3	70624.1	3	4	0.0613	Plasmodium berghei ANKA rhopty-associated protein 1, putative (RAP1) protein length=604
PBANKA_120610	3	62149.9	3	4	0.0931	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7, putative protein length=537
PBANKA_121020	4	111115.8	4	4	0.0577	Plasmodium berghei ANKA PRE-binding protein, putative (PREBP) protein length=970

PBANKA_121100	2	62632.9	2	4	0.0294	Plasmodium berghei ANKA GMP synthetase, putative (GMPS) protein length=544
PBANKA_122250	3	62683.1	3	4	0.0884	Plasmodium berghei ANKA plasmepsin X protein length=554
PBANKA_122280	3	43300.8	3	4	0.1210	Plasmodium berghei ANKA tyrosine--tRNA ligase, putative protein length=372
PBANKA_122580	2	23866	2	4	0.1095	Plasmodium berghei ANKA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative (CYP24) protein length=210
PBANKA_122660	1	51558.9	1	4	0.0199	Plasmodium berghei ANKA tubulin gamma chain, putative protein length=452
PBANKA_123350	3	137143	3	4	0.0397	Plasmodium berghei ANKA mRNA-binding protein PUF1 (PUF1) protein length=1183
PBANKA_130500	1	26486.7	1	4	0.1217	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=230
PBANKA_136430	3	56501.5	3	4	0.0898	Plasmodium berghei ANKA glycerol kinase, putative protein length=501
PBANKA_141110	3	49809.8	3	4	0.0557	Plasmodium berghei ANKA 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial (BCKDHA) protein length=431
PBANKA_142360	2	16332.1	2	4	0.1736	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S16, putative protein length=144
PBANKA_144070	3	128855.4	3	4	0.0259	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-activating enzyme E1, putative (UBA1) protein length=1120
PBANKA_144680	2	79764.8	2	4	0.0523	Plasmodium berghei ANKA 60 kDa chaperonin, putative (CPN60) protein length=707
PBANKA_145330	1	86929.9	1	4	0.0239	Plasmodium berghei ANKA acyl-CoA synthetase, putative protein length=754
PBANKA_010550	1	25259.5	1	3	0.0602	Plasmodium berghei ANKA glutaredoxin-like protein (GLP2) protein length=216
PBANKA_030060	3	72409.4	3	3	0.0354	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=650
PBANKA_031060	1	17709.4	1	3	0.1948	Plasmodium berghei ANKA conserved protein, unknown function protein length=154
PBANKA_041610	3	684398.2	3	3	0.0024	Plasmodium berghei ANKA dynein heavy chain, putative protein length=5834
PBANKA_050110	3	16759	3	3	0.1429	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein,small exported protein (SEP3) protein length=154
PBANKA_061520	3	60533.3	3	3	0.0606	Plasmodium berghei ANKA calcium-dependent protein kinase 4 (CDPK4) protein length=528
PBANKA_080310	2	94594.3	2	3	0.0508	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM7, putative (MCM7) protein length=827
PBANKA_080430	2	98031.6	2	3	0.0152	Plasmodium berghei ANKA DNA mismatch repair protein MSH2 (MSH2-2) protein length=853
PBANKA_081610	2	18156.3	2	3	0.2264	Plasmodium berghei ANKA SUMO-conjugating enzyme UBC9, putative (UBC9) protein length=159
PBANKA_083400	2	25558.2	2	3	0.1806	Plasmodium berghei ANKA calyculin binding protein, putative protein length=216
PBANKA_091020	2	89049.9	2	3	0.0864	Plasmodium berghei ANKA protein phosphatase 2C, putative protein length=787
PBANKA_091430	3	49164.5	3	3	0.0757	Plasmodium berghei ANKA protein disulfide isomerase related protein, putative protein length=423
PBANKA_092480	2	135471.8	2	3	0.0143	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1192
PBANKA_100610	1	54490.2	1	3	0.0522	Plasmodium berghei ANKA flap endonuclease 1, putative (FEN1) protein length=479
PBANKA_101490	2	145511.3	2	3	0.0382	Plasmodium berghei ANKA coatamer protein, beta subunit, putative protein length=1256
PBANKA_102280	2	94962.8	2	3	0.0345	Plasmodium berghei ANKA glycine--tRNA ligase, putative (GlyRS) protein length=812

PBANKA_110290	1	101475.1	1	3	0.0196	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=869
PBANKA_110420	3	41566.4	3	3	0.1532	Plasmodium berghei ANKA 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial, putative (BCKDHB) protein length=372
PBANKA_110710	2	67253.3	2	3	0.0301	Plasmodium berghei ANKA subtilisin-like protease 1 (SUB1) protein length=599
PBANKA_110800	1	45570.8	1	3	0.0436	Plasmodium berghei ANKA transcription factor IIb, putative protein length=390
PBANKA_112020	2	32649.9	2	3	0.0909	Plasmodium berghei ANKA pyridoxine biosynthesis protein PDX1, putative (PDX1) protein length=297
PBANKA_113260	2	22756.6	2	3	0.1238	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-conjugating enzyme, putative protein length=202
PBANKA_120080	1	30158.9	1	3	0.0763	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=249
PBANKA_121070	1	22853.9	1	3	0.1771	Plasmodium berghei ANKA ubiquinol-cytochrome c reductase complex subunit, putative protein length=192
PBANKA_122310	2	29581.8	2	3	0.1385	Plasmodium berghei ANKA proteasome subunit alpha type-6, putative protein length=260
PBANKA_122920	2	21564.4	2	3	0.1889	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L19, putative protein length=180
PBANKA_123780	1	160818.7	1	3	0.0169	Plasmodium berghei ANKA multidrug resistance protein, putative (MDR1) protein length=1419
PBANKA_123790	2	61206.1	2	3	0.0524	Plasmodium berghei ANKA mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative protein length=534
PBANKA_131020	1	139639.9	1	3	0.0331	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function, fragment protein length=1238
PBANKA_132690	2	63597.6	2	3	0.0166	Plasmodium berghei ANKA DNA polymerase alpha subunit, putative protein length=541
PBANKA_134890	1	60945.2	1	3	0.0275	Plasmodium berghei ANKA chaperone binding protein, putative protein length=509
PBANKA_141130	2	117937	2	3	0.0188	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, putative (EIF4G) protein length=1013
PBANKA_144110	2	32735.1	2	3	0.1146	Plasmodium berghei ANKA haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative (HAD2) protein length=288
PBANKA_030650	1	55048.9	1	2	0.0198	Plasmodium berghei ANKA conserved protein, unknown function protein length=454
PBANKA_030690	1	9371.9	1	2	0.3373	Plasmodium berghei ANKA Sec61-gamma subunit of protein translocation complex, putative protein length=83
PBANKA_031450	2	12508.6	2	2	0.1215	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S26, putative (RPS26) protein length=107
PBANKA_031460	2	59542.3	2	2	0.0655	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=504
PBANKA_040420	1	15584.7	1	2	0.1583	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative protein length=139
PBANKA_041040	2	49688.1	2	2	0.0907	Plasmodium berghei ANKA glycogen synthase kinase 3 (GSK3) protein length=430
PBANKA_041280	1	26870.7	1	2	0.0793	Plasmodium berghei ANKA translation initiation factor 4E, putative (eIF4E) protein length=227
PBANKA_041660	2	56485.5	2	2	0.0473	Plasmodium berghei ANKA replication protein A1, small fragment protein length=486
PBANKA_050170	1	28275.3	1	2	0.0571	Plasmodium berghei ANKA phosphomannomutase, putative protein length=245
PBANKA_050690	1	50258.7	1	2	0.0278	Plasmodium berghei ANKA phospholipid scramblase, putative protein length=431
PBANKA_051720	2	33509.2	2	2	0.0676	Plasmodium berghei ANKA haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative (HAD1) protein length=296
PBANKA_051820	2	70383.7	2	2	0.0523	Plasmodium berghei ANKA flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase, putative (SDHA) protein length=631

PBANKA_061400	2	55657.5	2	2	0.0251	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=478
PBANKA_061720	2	16598.8	2	2	0.1387	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S10, putative protein length=137
PBANKA_062080	2	63674	2	2	0.0626	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=559
PBANKA_071600	2	141223.4	2	2	0.0201	Plasmodium berghei ANKA chromosome associated protein, putative protein length=1194
PBANKA_080060	2	12437.1	2	2	0.0935	Plasmodium berghei ANKA centrin, putative protein length=107
PBANKA_080760	2	18689.9	2	2	0.0932	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S11, putative (RPS11) protein length=161
PBANKA_081900	1	44260.6	1	2	0.0354	Plasmodium berghei ANKA secreted acid phosphatase, putative,glideosome-associated protein 50, putative (GAP50) protein length=395
PBANKA_082480	1	22881.3	1	2	0.1407	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=199
PBANKA_082800	2	142083.8	2	2	0.0178	Plasmodium berghei ANKA zinc finger protein, putative protein length=1233
PBANKA_083310	1	56314.3	1	2	0.0325	Plasmodium berghei ANKA M18 aspartyl aminopeptidase, putative (M18AAP) protein length=493
PBANKA_083530	1	27227.4	1	2	0.0468	Plasmodium berghei ANKA vacuolar ATP synthase subunit e, putative protein length=235
PBANKA_083620	1	79426	1	2	0.0201	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=698
PBANKA_090690	2	272989.3	2	2	0.0116	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=2336
PBANKA_092250	1	63382.2	1	2	0.0180	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=555
PBANKA_093370	2	61065.6	2	2	0.0727	Plasmodium berghei ANKA mitogen-activated protein kinase 2 (MAPK2) protein length=523
PBANKA_093650	1	40473.2	1	2	0.0401	Plasmodium berghei ANKA replication factor C subunit 5, putative (RFC5) protein length=349
PBANKA_101060	2	16906	2	2	0.3557	Plasmodium berghei ANKA calmodulin, putative (CAM) protein length=149
PBANKA_101310	2	17895.1	2	2	0.1026	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L14, putative protein length=156
PBANKA_102350	1	55025.7	1	2	0.0723	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=470
PBANKA_102830	1	34922.6	2	2	0.0493	Plasmodium berghei ANKA serine/threonine protein phosphatase PP1 (PP1) protein length=304
PBANKA_103370	1	35862	1	2	0.1010	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=307
PBANKA_103730	2	34045.4	2	2	0.1027	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=292
PBANKA_103790	2	18080.9	2	2	0.3290	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=155
PBANKA_111270	2	30548.6	2	2	0.0784	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=268
PBANKA_111740	1	23879	1	2	0.1029	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=204
PBANKA_112070	1	20789.3	1	2	0.0919	Plasmodium berghei ANKA nascent polypeptide associated complex alpha chain, putative protein length=185
PBANKA_112280	1	33245.1	1	2	0.0486	Plasmodium berghei ANKA ribonuclease H2 subunit A, putative protein length=288
PBANKA_113410	2	57883.4	2	2	0.0870	Plasmodium berghei ANKA TCP-1/cpn60 chaperonin, putative protein length=529
PBANKA_113800	1	23678.8	1	2	0.0758	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=198
PBANKA_114060	1	24008.8	1	2	0.1122	Plasmodium berghei ANKA DNA-directed RNA polymerase II, putative protein length=205

PBANKA_120060	2	250881.9	2	2	0.0095	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=2206
PBANKA_120940	2	16389.3	2	2	0.0559	Plasmodium berghei ANKA inner membrane complex sub-compartment protein 1 (ISP1) protein length=143
PBANKA_121900	1	93929.2	1	2	0.0204	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 90, putative protein length=785
PBANKA_130220	2	44468.6	2	2	0.1105	Plasmodium berghei ANKA translocation protein sec62, putative protein length=380
PBANKA_130330	1	41039.4	1	2	0.0616	Plasmodium berghei ANKA ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit, putative protein length=357
PBANKA_131750	2	109618.9	2	2	0.0305	Plasmodium berghei ANKA glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase (G6PD-6PGL) protein length=950
PBANKA_131920	1	121418	1	2	0.0216	Plasmodium berghei ANKA AP-1 complex subunit gamma, putative protein length=1067
PBANKA_132010	2	93268.5	2	2	0.0127	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function (UIS25) protein length=789
PBANKA_132630	1	46007.9	1	2	0.0279	Plasmodium berghei ANKA cytochrome c1 precursor, putative protein length=394
PBANKA_133000	1	31903.4	1	2	0.0623	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=273
PBANKA_133710	1	82473.2	1	2	0.0296	Plasmodium berghei ANKA splicing factor 1, putative (SF1) protein length=710
PBANKA_134580	2	55898.3	2	2	0.0581	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=499
PBANKA_135550	2	40488.7	2	2	0.0610	Plasmodium berghei ANKA casein kinase II beta chain, putative (CK2beta2) protein length=344
PBANKA_140670	1	247471.5	1	2	0.0088	Plasmodium berghei ANKA carbamoyl phosphate synthetase, putative protein length=2153
PBANKA_140700	2	53561.1	2	2	0.0811	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=456
PBANKA_140760	1	18920.4	1	2	0.0675	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L24, putative protein length=163
PBANKA_141290	2	13865.3	2	2	0.1382	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=123
PBANKA_141560	2	107417	2	2	0.0350	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM4, putative (MCM4) protein length=944
PBANKA_143150	1	42125.5	1	2	0.0390	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=359
PBANKA_143470	2	229999.6	2	2	0.0176	Plasmodium berghei ANKA clathrin heavy chain, putative protein length=1986
PBANKA_144970	1	7601.6	1	2	0.2353	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=68
PBANKA_145250	1	80964.5	1	2	0.0332	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=722
PBANKA_145260	1	26567.8	1	2	0.0487	Plasmodium berghei ANKA calcyclin binding protein, putative protein length=226
PBANKA_146040	1	34983.8	1	2	0.0490	Plasmodium berghei ANKA FK506-binding protein (FKBP)-type peptidyl-prolyl isomerase, putative (FKBP35) protein length=306
PBANKA_010500	1	17016.6	1	1	0.1611	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative protein length=149
PBANKA_010890	1	14298.6	1	1	0.1626	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=123
PBANKA_011040	1	67608.3	1	1	0.0546	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L, putative protein length=568
PBANKA_020720	1	45226.1	1	1	0.0392	Plasmodium berghei ANKA vacuolar ATP synthase subunit c, putative protein length=383
PBANKA_021550	0	45147.6	1	1	0.0284	Plasmodium berghei ANKA erythrocyte membrane associated protein 2 (EMAP2) protein length=387

PBANKA_031470	1	37628.6	1	1	0.0455	Plasmodium berghei ANKA replication factor C subunit 2, putative protein length=330
PBANKA_031680	0	45147.6	1	1	0.0284	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=387
PBANKA_040110	1	153538.2	1	1	0.0061	Plasmodium berghei ANKA serine/threonine protein kinase, putative (SRPK1) protein length=1306
PBANKA_041740	1	40469.7	1	1	0.0407	Plasmodium berghei ANKA GTPase-activating protein, putative protein length=344
PBANKA_060420	1	133016.3	1	1	0.0215	Plasmodium berghei ANKA zinc finger protein, putative protein length=1165
PBANKA_060680	1	18629.5	1	1	0.0949	Plasmodium berghei ANKA mitochondrial ACP precursor, putative protein length=158
PBANKA_061220	1	143590	1	1	0.0136	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1251
PBANKA_061320	1	198795	1	1	0.0135	Plasmodium berghei ANKA DNA polymerase alpha, putative protein length=1709
PBANKA_061860	1	27530.6	1	1	0.0979	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=235
PBANKA_062330	1	41866.7	1	1	0.0614	Plasmodium berghei ANKA tryptophan-rich antigen, putative protein length=342
PBANKA_071090	1	10482.4	1	1	0.1319	Plasmodium berghei ANKA U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM3, putative (LSM3) protein length=91
PBANKA_071330	1	21076.2	1	1	0.1559	Plasmodium berghei ANKA protein kinase c inhibitor-like protein, putative protein length=186
PBANKA_071930	1	68821.6	1	1	0.0375	Plasmodium berghei ANKA bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase, putative (DHFR-TS) protein length=587
PBANKA_071970	1	88550.5	1	1	0.0172	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=755
PBANKA_080150	1	88645.7	1	1	0.0309	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=745
PBANKA_080320	1	295481.9	1	1	0.0060	Plasmodium berghei ANKA inositol-phosphate phosphatase, putative protein length=2511
PBANKA_080910	1	32773.9	1	1	0.0755	Plasmodium berghei ANKA subunit of proteasome activator complex, putative protein length=278
PBANKA_080940	1	47544.7	1	1	0.0347	Plasmodium berghei ANKA P1 nuclease, putative protein length=404
PBANKA_081190	1	49327.8	1	1	0.0276	Plasmodium berghei ANKA cytosolic Fe-S cluster assembly factor NBP35, putative (NBP35) protein length=434
PBANKA_081670	1	22342.9	1	1	0.1421	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=190
PBANKA_081910	1	17348	1	1	0.0811	Plasmodium berghei ANKA cytochrome b5, putative protein length=148
PBANKA_082290	1	93454.5	1	1	0.0213	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=797
PBANKA_082860	1	32169.1	1	1	0.0693	Plasmodium berghei ANKA cytochrome c oxidase subunit 5B, putative (COX5B) protein length=274
PBANKA_083580	1	22166.4	1	1	0.0885	Plasmodium berghei ANKA U2 small nuclear ribonucleoprotein B", putative protein length=192
PBANKA_090140	1	17515.1	1	1	0.1558	Plasmodium berghei ANKA mitochondrial ATP synthase delta subunit, putative protein length=154
PBANKA_090540	1	27863	1	1	0.0588	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=238
PBANKA_091370	1	57443.5	1	1	0.0202	Plasmodium berghei ANKA coatomer delta subunit, putative protein length=494
PBANKA_091500	1	63691.2	1	1	0.0414	Plasmodium berghei ANKA apical membrane antigen 1 (AMA1) protein length=556
PBANKA_091740	1	57694.3	1	1	0.0373	Plasmodium berghei ANKA armadillo repeat protein PF16 (PF16) protein length=509

PBANKA_091900	1	46524.6	1	1	0.0433	Plasmodium berghei ANKA 26S proteasome regulatory subunit RPN7, putative (RPN7) protein length=393
PBANKA_092360	1	32847.4	1	1	0.0491	Plasmodium berghei ANKA GrpE protein homolog, mitochondrial, putative (MGE1) protein length=285
PBANKA_093120	1	103119.1	1	1	0.0232	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 101 (HSP101) protein length=907
PBANKA_094000	1	20256.7	1	1	0.0833	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=168
PBANKA_100310	1	344141.6	1	1	0.0081	Plasmodium berghei ANKA pre-mRNA-processing-splicing factor 8, putative (PRPF8) protein length=2949
PBANKA_100720	1	135490.3	1	1	0.0205	Plasmodium berghei ANKA replication protein A1, large subunit, putative (RPA1) protein length=1170
PBANKA_101140	1	168494.4	1	1	0.0177	Plasmodium berghei ANKA DNA topoisomerase II, putative protein length=1472
PBANKA_102550	1	481536.3	1	1	0.0084	Plasmodium berghei ANKA NOT family protein, putative protein length=4169
PBANKA_102660	1	106757.7	1	1	0.0219	Plasmodium berghei ANKA GTP-binding protein, putative protein length=913
PBANKA_103660	1	40441.5	1	1	0.0458	Plasmodium berghei ANKA ribonucleotide reductase small subunit, putative protein length=349
PBANKA_110720	1	74962.5	1	1	0.0561	Plasmodium berghei ANKA cell differentiation protein, putative (CAF40) protein length=677
PBANKA_111230	1	22873.7	1	1	0.1200	Plasmodium berghei ANKA ras-related protein Rab-1B, putative (RAB1b) protein length=200
PBANKA_113620	1	21513.1	1	1	0.0621	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=177
PBANKA_113820	1	53794.5	1	1	0.0358	Plasmodium berghei ANKA RuvB-like helicase 3, putative (RUVB3) protein length=475
PBANKA_114410	1	70079.4	1	1	0.0275	Plasmodium berghei ANKA RNase L inhibitor protein, putative protein length=619
PBANKA_120210	1	133217.2	1	1	0.0087	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1146
PBANKA_120270	1	86602.9	1	1	0.0140	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=715
PBANKA_120850	1	33791	1	1	0.0629	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=286
PBANKA_122210	1	74190.4	1	1	0.0185	Plasmodium berghei ANKA regulator of chromosome condensation, putative protein length=650
PBANKA_123150	1	142292.7	1	1	0.0115	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2, putative protein length=1218
PBANKA_123680	1	80002.5	1	1	0.0159	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=690
PBANKA_124280	1	62502	1	1	0.0190	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6, putative protein length=527
PBANKA_130350	1	22270.7	1	1	0.1167	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=180
PBANKA_130450	1	55254.9	1	1	0.0260	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=461
PBANKA_134810	1	27065.8	1	1	0.0649	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=231
PBANKA_135630	1	110869	1	1	0.0251	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=955
PBANKA_135960	1	52854.5	1	1	0.0681	Plasmodium berghei ANKA 6-cysteine protein (P48/45) protein length=455
PBANKA_142070	1	73694.8	1	1	0.0162	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=618
PBANKA_142940	1	10749.4	1	1	0.2366	Plasmodium berghei ANKA dynein light chain 1, putative protein length=93
PBANKA_142960	1	88080.9	1	1	0.0146	Plasmodium berghei ANKA proline--tRNA ligase, putative protein length=755

PBANKA_143240	1	114257.2	1	1	0.0340	Plasmodium berghei ANKA perforin-like protein 2 (PLP2) protein length=999
PBANKA_144510	1	22856.8	1	1	0.0773	Plasmodium berghei ANKA ATP-dependent protease subunit ClpQ, putative (ClpQ) protein length=207
PBANKA_144950	1	15669.3	1	1	0.0612	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=147
PBANKA_146390	1	21562.3	1	1	0.0492	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=183

Suppl. Table S2. Δ kin8 *P. berghei* phosphorylated proteins identified during gametogenesis.

Accession number	#Unique Peptides	MW	Sequence Count	Spectrum Count	Coverage	Description
PBANKA_071190	31	75155	33	88	0.5310	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70 (HSP70) protein length=693
PBANKA_132640	26	36541	26	88	0.8160	Plasmodium berghei ANKA glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, putative (GAPDH) protein length=337
PBANKA_120690	27	49739.9	28	80	0.7236	Plasmodium berghei ANKA tubulin beta chain, putative protein length=445
PBANKA_113330	0	48909.9	20	71	0.5508	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443
PBANKA_113340	0	48909.9	20	71	0.5508	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) protein length=443
PBANKA_143220	17	24252.8	17	60	0.6589	Plasmodium berghei ANKA male development gene 1 (MDV1) protein length=214
PBANKA_081890	25	72084.9	25	55	0.4777	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70, putative protein length=651
PBANKA_070280	20	55358.1	20	47	0.4564	Plasmodium berghei ANKA protein disulfide isomerase protein length=482
PBANKA_130130	12	39026.9	12	44	0.5401	Plasmodium berghei ANKA trailer hitch homolog, putative (CITH) protein length=337
PBANKA_052270	4	49669.3	12	38	0.3800	Plasmodium berghei ANKA alpha tubulin 2 protein length=450
PBANKA_071260	14	30166.7	14	33	0.5992	Plasmodium berghei ANKA 14-3-3 protein (14-3-3I) protein length=262
PBANKA_121430	15	48977.4	15	31	0.4529	Plasmodium berghei ANKA enolase, putative (ENO) protein length=446
PBANKA_112560	8	55493.8	8	29	0.3170	Plasmodium berghei ANKA pyruvate kinase, putative protein length=511
PBANKA_041770	2	50156.3	10	27	0.3223	Plasmodium berghei ANKA alpha tubulin 1 protein length=453
PBANKA_121470	13	111954.5	13	27	0.2383	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=961
PBANKA_143920	11	93239.1	11	22	0.2158	Plasmodium berghei ANKA polyadenylate-binding protein, putative (PABP) protein length=834
PBANKA_101670	9	32689.7	9	21	0.3513	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=279
PBANKA_142330	7	26845.5	7	20	0.3182	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 1, putative (ALBA1) protein length=242

PBANKA_020300	9	50481.8	9	19	0.2354	Plasmodium berghei ANKA chromatin assembly factor 1 protein WD40 domain, putative protein length=446
PBANKA_082340	8	45448.1	8	19	0.2837	Plasmodium berghei ANKA phosphoglycerate kinase, putative (PGK) protein length=416
PBANKA_093420	5	41217.1	5	19	0.3360	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin domain-containing protein DSK2, putative (DSK2) protein length=375
PBANKA_111860	4	90764.2	4	19	0.0798	Plasmodium berghei ANKA cell division cycle protein 48 homologue, putative protein length=815
PBANKA_113570	3	57133.8	3	19	0.1585	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=511
PBANKA_020160	5	18642.4	5	18	0.4915	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein (ETRAMP) protein length=177
PBANKA_136030	3	42121.4	3	18	0.1872	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 4, putative (ALBA4) protein length=374
PBANKA_114170	2	14589.9	7	17	0.4766	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-60S ribosomal protein L40, putative protein length=128
PBANKA_121930	6	94821.3	6	17	0.1100	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 110, putative (HSP110c) protein length=836
PBANKA_134040	8	36916.3	8	17	0.3413	Plasmodium berghei ANKA oxidoreductase, putative protein length=334
PBANKA_030130	4	9784.8	4	16	0.2967	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=91
PBANKA_130860	9	39808.9	9	16	0.3442	Plasmodium berghei ANKA fructose-bisphosphate aldolase 2 (ALDO2) protein length=369
PBANKA_142690	8	104135.3	8	14	0.1265	Plasmodium berghei ANKA RNA helicase, putative protein length=909
PBANKA_080570	7	83143.2	7	13	0.1458	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 90, putative (HSP90) protein length=720
PBANKA_114480	3	42374	3	13	0.1828	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=361
PBANKA_083300	4	19236.1	4	12	0.5345	Plasmodium berghei ANKA profilin, putative (PFN) protein length=174
PBANKA_131480	7	93297.2	7	12	0.1382	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 2, putative protein length=832
PBANKA_145780	5	33119.2	5	12	0.2703	Plasmodium berghei ANKA ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, putative (ARFGAP) protein length=296
PBANKA_091910	6	44649.8	6	11	0.1572	Plasmodium berghei ANKA parasitophorous vacuolar protein 1, putative (PV1) protein length=388
PBANKA_121850	5	16636.2	5	11	0.3194	Plasmodium berghei ANKA protein phosphatase inhibitor 2, putative protein length=144
PBANKA_141910	2	47783.5	2	11	0.0662	Plasmodium berghei ANKA dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, putative protein length=423
PBANKA_143730	4	93169.2	4	11	0.0842	Plasmodium berghei ANKA endoplasmic reticulum chaperone protein, putative (GRP94) protein length=808
PBANKA_144900	6	65322.5	6	11	0.1664	Plasmodium berghei ANKA aspartyl protease, putative protein length=577
PBANKA_081420	4	29995.1	4	10	0.2140	Plasmodium berghei ANKA elongation factor 1-beta, putative protein length=257
PBANKA_103270	6	58837.1	6	10	0.1696	Plasmodium berghei ANKA RNA binding protein Bruno, putative (HoBo) protein length=507
PBANKA_051990	7	180209.2	7	9	0.1295	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1591
PBANKA_061920	2	54662.5	2	9	0.0710	Plasmodium berghei ANKA secreted ookinete protein, putative (PSOP1) protein length=479
PBANKA_070470	4	57214.4	4	9	0.0986	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=487
PBANKA_111300	3	26971.7	3	9	0.1926	Plasmodium berghei ANKA purine nucleoside phosphorylase, putative (PNP) protein length=244

PBANKA_093960	5	368279.4	5	8	0.0264	Plasmodium berghei ANKA polyadenylate-binding protein-interacting protein 1, putative (PAIP1) protein length=3296
PBANKA_101050	4	65585.2	4	8	0.1020	Plasmodium berghei ANKA Hsp70/Hsp90 organizing protein, putative (HOP) protein length=559
PBANKA_121770	5	49325.6	5	8	0.1755	Plasmodium berghei ANKA ATP-dependent RNA helicase DDX6 (DOZI) protein length=433
PBANKA_124440	5	9931.8	5	8	0.2209	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=86
PBANKA_134010	2	34384.1	2	8	0.1203	Plasmodium berghei ANKA L-lactate dehydrogenase (LDH) protein length=316
PBANKA_145930	4	41840	5	8	0.1197	Plasmodium berghei ANKA actin I protein length=376
PBANKA_031100	2	156519.8	2	7	0.0418	Plasmodium berghei ANKA protein transport protein SEC31, putative (SEC31) protein length=1388
PBANKA_061160	3	96972	3	7	0.0779	Plasmodium berghei ANKA ribonucleoside-diphosphate reductase, large subunit, putative protein length=847
PBANKA_083100	2	198529.4	2	7	0.0235	Plasmodium berghei ANKA merozoite surface protein 1 (MSP1) protein length=1791
PBANKA_093030	3	24852.8	3	7	0.2617	Plasmodium berghei ANKA GTP-binding nuclear protein RAN/TC4, putative protein length=214
PBANKA_093770	2	12700.3	2	7	0.1947	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L36, putative (RPL36) protein length=113
PBANKA_093840	3	39080.3	3	7	0.2339	Plasmodium berghei ANKA endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein, putative protein length=342
PBANKA_111340	5	85042.1	5	7	0.1290	Plasmodium berghei ANKA secreted ookinete protein, putative,6-cysteine protein (PSOP12) protein length=721
PBANKA_111520	6	132736.1	6	7	0.0518	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1138
PBANKA_113510	4	17228.6	4	7	0.3179	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S15, putative (RPS15) protein length=151
PBANKA_121650	3	18788.3	3	7	0.2059	Plasmodium berghei ANKA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative (CYP19A) protein length=170
PBANKA_142350	5	25385	5	7	0.2837	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L13-2, putative protein length=215
PBANKA_145070	4	45627.5	4	7	0.2217	Plasmodium berghei ANKA clustered-asparagine-rich protein, putative protein length=397
PBANKA_146300	6	309004.2	6	7	0.0315	Plasmodium berghei ANKA osmiophilic body protein (G377) protein length=2606
PBANKA_050660	2	55599.8	2	6	0.0457	Plasmodium berghei ANKA serine/arginine-rich splicing factor 4, putative (SRSF4) protein length=481
PBANKA_052420	3	16719.9	3	6	0.1613	Plasmodium berghei ANKA early transcribed membrane protein,small exported protein (SEP2) protein length=155
PBANKA_100610	1	54490.2	1	6	0.0522	Plasmodium berghei ANKA flap endonuclease 1, putative (FEN1) protein length=479
PBANKA_101000	1	28870.9	1	6	0.0794	Plasmodium berghei ANKA mitochondrial acidic protein MAM33, putative protein length=252
PBANKA_120440	4	11965.3	4	6	0.5607	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 3, putative (ALBA3) protein length=107
PBANKA_130070	3	183560.8	3	6	0.0310	Plasmodium berghei ANKA LCCL domain-containing protein (CCp1) protein length=1615
PBANKA_132970	2	137982.7	2	6	0.0254	Plasmodium berghei ANKA 26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative (RPN2) protein length=1219
PBANKA_135510	4	35429.9	4	6	0.1677	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S6, putative protein length=310
PBANKA_141630	2	16847.3	2	6	0.1310	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S19, putative (RPS19) protein length=145
PBANKA_010080	2	157332.9	2	5	0.0326	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1382

PBANKA_031060	1	17709.4	1	5	0.1948	Plasmodium berghei ANKA conserved protein, unknown function protein length=154
PBANKA_040470	2	12361.4	2	5	0.3486	Plasmodium berghei ANKA glutaredoxin 1, putative (GRX1) protein length=109
PBANKA_040760	1	66318.9	1	5	0.0396	Plasmodium berghei ANKA asparagine synthetase, putative protein length=581
PBANKA_040770	3	11778.8	3	5	0.1261	Plasmodium berghei ANKA 60S acidic ribosomal protein P2, putative protein length=111
PBANKA_050580	3	29223.5	3	5	0.1756	Plasmodium berghei ANKA deoxyribose-phosphate aldolase, putative protein length=262
PBANKA_101850	3	19905.6	3	5	0.1897	Plasmodium berghei ANKA transcription factor 3b, putative protein length=174
PBANKA_103440	3	50432.6	3	5	0.1400	Plasmodium berghei ANKA plasmepsin IV (PM4) protein length=450
PBANKA_130380	4	27807.4	4	5	0.2339	Plasmodium berghei ANKA triosephosphate isomerase, putative (TIM) protein length=248
PBANKA_142430	5	32548.1	5	5	0.2077	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=284
PBANKA_143105	3	10972.9	3	5	0.3235	Plasmodium berghei ANKA 10 kDa chaperonin, putative (CPN10) protein length=102
PBANKA_040110	2	153538.2	2	4	0.0061	Plasmodium berghei ANKA serine/threonine protein kinase, putative (SRPK1) protein length=1306
PBANKA_060430	2	38739.5	2	4	0.1152	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=330
PBANKA_091620	2	60078.6	2	4	0.0276	Plasmodium berghei ANKA TCP-1/cpn60 chaperonin family, putative protein length=543
PBANKA_093110	3	24745.5	3	4	0.2192	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=219
PBANKA_094360	3	12871.5	3	4	0.4370	Plasmodium berghei ANKA 60S acidic ribosomal protein P1, putative protein length=119
PBANKA_101940	4	33244.8	4	4	0.1408	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L7-3, putative protein length=284
PBANKA_103390	2	24959.3	2	4	0.0734	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S8e, putative protein length=218
PBANKA_111700	0	14194.8	1	4	0.0677	Plasmodium berghei ANKA histone H2A, putative (H2A) protein length=133
PBANKA_120610	2	62149.9	2	4	0.0670	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7, putative protein length=537
PBANKA_121400	2	62189.5	2	4	0.0846	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 60, putative protein length=579
PBANKA_121760	0	16465.4	1	4	0.0570	Plasmodium berghei ANKA histone H2A variant, putative (H2A.Z) protein length=158
PBANKA_130280	2	21622.3	2	4	0.1897	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin peroxidase 1 (TPx1) protein length=195
PBANKA_133840	1	14023.5	1	4	0.1818	Plasmodium berghei ANKA vacuolar ATP synthase subunit g, putative protein length=121
PBANKA_000510	1	94098.1	1	3	0.0353	Plasmodium berghei ANKA reticulocyte binding protein, putative (Pb235) protein length=793
PBANKA_030510	2	154804.4	2	3	0.0505	Plasmodium berghei ANKA serine repeat antigen 1 (SERA1) protein length=1406
PBANKA_040520	2	59033.4	2	3	0.0600	Plasmodium berghei ANKA T-complex protein beta subunit, putative protein length=533
PBANKA_061540	2	61773.3	2	3	0.0653	Plasmodium berghei ANKA serine--tRNA ligase, putative protein length=536
PBANKA_081990	3	31650.8	3	3	0.2060	Plasmodium berghei ANKA nucleosome assembly protein (NAPS) protein length=267
PBANKA_082300	2	161341.7	2	3	0.0210	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-like protein, putative protein length=1384
PBANKA_092130	2	19697.1	2	3	0.2629	Plasmodium berghei ANKA deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, putative protein length=175

PBANKA_092670	2	17914.5	2	3	0.3554	Plasmodium berghei ANKA exported protein 1, putative, circumsporozoite-related antigen (EXP1) protein length=166
PBANKA_092820	2	93642.7	2	3	0.0355	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=788
PBANKA_100950	2	336064.3	2	3	0.0074	Plasmodium berghei ANKA NAD(P)H-dependent glutamate synthase, putative protein length=2962
PBANKA_110670	2	46085.3	2	3	0.0584	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L4, putative (RPL4) protein length=411
PBANKA_111140	1	69610.4	1	3	0.0412	Plasmodium berghei ANKA inositol-3-phosphate synthase, putative (INO1) protein length=607
PBANKA_113700	2	133431.5	2	3	0.0235	Plasmodium berghei ANKA bergheilysin (BLN) protein length=1149
PBANKA_121560	3	29947.3	3	3	0.1603	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S3A, putative protein length=262
PBANKA_123210	2	36233.1	2	3	0.0667	Plasmodium berghei ANKA pre-mRNA-splicing factor, putative (SR1) protein length=315
PBANKA_131020	1	139639.9	1	3	0.0331	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function, fragment protein length=1238
PBANKA_133190	2	45322.5	2	3	0.1055	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic initiation factor 4a, putative (eIF4A) protein length=398
PBANKA_135920	1	23532	1	3	0.1089	Plasmodium berghei ANKA DNA/RNA-binding protein Alba 2, putative (ALBA2) protein length=202
PBANKA_136550	3	37365.3	3	3	0.0979	Plasmodium berghei ANKA intra-erythrocytic P. berghei-induced structures protein 1 (IBIS1) protein length=327
PBANKA_141130	2	117937	2	3	0.0484	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, putative (EIF4G) protein length=1013
PBANKA_010330	1	234947.2	1	2	0.0084	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=2033
PBANKA_020134	1	12965.4	1	2	0.1101	Plasmodium berghei ANKA fam-c protein protein length=109
PBANKA_030500	2	123889.8	2	2	0.0419	Plasmodium berghei ANKA serine repeat antigen 2 (SERA2) protein length=1122
PBANKA_040180	2	126401.7	2	2	0.0293	Plasmodium berghei ANKA HAD superfamily protein, putative protein length=1093
PBANKA_050810	2	304513.5	2	2	0.0086	Plasmodium berghei ANKA chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1, putative (CHD1) protein length=2673
PBANKA_060320	1	17524.7	1	2	0.0870	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 5A, putative (EIF5A) protein length=161
PBANKA_060420	1	133016.3	1	2	0.0086	Plasmodium berghei ANKA zinc finger protein, putative protein length=1165
PBANKA_071660	1	29402.7	1	2	0.1725	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=255
PBANKA_080760	2	18689.9	2	2	0.0932	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S11, putative (RPS11) protein length=161
PBANKA_081640	1	146654.8	1	2	0.0239	Plasmodium berghei ANKA 6-phosphofructokinase, putative (PFK9) protein length=1299
PBANKA_082670	1	25218.7	1	2	0.1081	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=222
PBANKA_082800	2	142083.8	2	2	0.0178	Plasmodium berghei ANKA zinc finger protein, putative protein length=1233
PBANKA_083530	1	27227.4	1	2	0.0979	Plasmodium berghei ANKA vacuolar ATP synthase subunit e, putative protein length=235
PBANKA_090360	2	93443.4	2	2	0.0504	Plasmodium berghei ANKA dynamin-like protein, putative (DYN1) protein length=814
PBANKA_090500	1	9166.6	1	2	0.1098	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S21, putative (RPS21) protein length=82
PBANKA_090880	2	36997.4	2	2	0.0698	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=315

PBANKA_091440	2	73103.1	2	2	0.0528	Plasmodium berghei ANKA heat shock protein 70, putative (UIS24) protein length=663
PBANKA_092810	2	28671.1	2	2	0.1160	Plasmodium berghei ANKA phosphoglycerate mutase, putative (PGM1) protein length=250
PBANKA_093220	1	21179.1	1	2	0.0729	Plasmodium berghei ANKA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative protein length=192
PBANKA_094000	1	20256.7	1	2	0.0833	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=168
PBANKA_100910	2	93964.1	2	2	0.0391	Plasmodium berghei ANKA ataxin-2 like protein, putative protein length=818
PBANKA_101320	1	51484.5	1	2	0.0808	Plasmodium berghei ANKA ATP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit, putative protein length=458
PBANKA_101950	2	33843.2	2	2	0.1536	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L5, putative protein length=293
PBANKA_101970	2	136787.1	2	2	0.0400	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1176
PBANKA_103660	1	40441.5	1	2	0.0458	Plasmodium berghei ANKA ribonucleotide reductase small subunit, putative protein length=349
PBANKA_110220	1	46689.2	1	2	0.0733	Plasmodium berghei ANKA merozoite surface protein 8 (MSP8) protein length=409
PBANKA_111050	1	19843.7	1	2	0.0819	Plasmodium berghei ANKA translationally-controlled tumor protein homolog, putative (TCTP) protein length=171
PBANKA_111770	2	34273.8	2	2	0.0479	Plasmodium berghei ANKA malate dehydrogenase, putative (MDH) protein length=313
PBANKA_121090	1	68099	1	2	0.0202	Plasmodium berghei ANKA phosphoglucomutase, putative protein length=593
PBANKA_123100	2	16046.7	2	2	0.1060	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S11, putative protein length=151
PBANKA_123170	2	27855.1	2	2	0.0962	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L2, putative (RPL2) protein length=260
PBANKA_123220	2	127467.2	2	2	0.0219	Plasmodium berghei ANKA FACT complex subunit SPT16 (FACT-L) protein length=1096
PBANKA_124180	1	107214.3	1	2	0.0243	Plasmodium berghei ANKA DNA replication licensing factor MCM3, putative (MCM3) protein length=945
PBANKA_124190	1	17176	1	2	0.1126	Plasmodium berghei ANKA ubiquitin-conjugating enzyme E2 N, putative (UBC13) protein length=151
PBANKA_130500	1	26486.7	1	2	0.1217	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=230
PBANKA_131270	1	28760.4	1	2	0.0843	Plasmodium berghei ANKA gamete egress and sporozoite traversal protein (GEST) protein length=249
PBANKA_132010	2	93268.5	2	2	0.0304	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function (UIS25) protein length=789
PBANKA_133000	1	31903.4	1	2	0.0623	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=273
PBANKA_135630	1	110869	1	2	0.0251	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=955
PBANKA_142870	2	152338.9	2	2	0.0253	Plasmodium berghei ANKA eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10, putative protein length=1263
PBANKA_144950	1	15669.3	1	2	0.0612	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=147
PBANKA_144970	1	7601.6	1	2	0.2353	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=68
PBANKA_145020	1	49575.4	1	2	0.0407	Plasmodium berghei ANKA serine hydroxymethyltransferase, putative (SHMT) protein length=442
PBANKA_010390	1	81987.8	1	1	0.0259	Plasmodium berghei ANKA RNA-binding protein, putative protein length=735
PBANKA_010730	1	61375.9	1	1	0.0460	Plasmodium berghei ANKA chaperone, putative protein length=543
PBANKA_020450	1	121466.2	1	1	0.0191	Plasmodium berghei ANKA LCCL domain-containing protein (CCp5) protein length=1049

PBANKA_030860	1	66393.6	1	1	0.0313	Plasmodium berghei ANKA asparagine--tRNA ligase, putative protein length=575
PBANKA_040860	1	27965	1	1	0.0936	Plasmodium berghei ANKA SAC3/GNAP family-related protein, putative protein length=235
PBANKA_041750	1	15495.6	1	1	0.1298	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L32, putative (RPL32) protein length=131
PBANKA_050360	1	11787.1	1	1	0.1759	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L30e, putative protein length=108
PBANKA_051280	1	66720.1	1	1	0.0518	Plasmodium berghei ANKA merozoite TRAP-like protein, putative (MTRAP) protein length=618
PBANKA_060160	1	201781	1	1	0.0092	Plasmodium berghei ANKA conserved protein, unknown function protein length=1738
PBANKA_060270	1	40275.8	1	1	0.0377	Plasmodium berghei ANKA nucleosome assembly protein, putative (NAPL) protein length=345
PBANKA_061220	1	143590	1	1	0.0136	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1251
PBANKA_061320	1	198795	1	1	0.0135	Plasmodium berghei ANKA DNA polymerase alpha, putative protein length=1709
PBANKA_061720	1	16598.8	1	1	0.1387	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S10, putative protein length=137
PBANKA_062080	1	63674	1	1	0.0465	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=559
PBANKA_062130	1	204990.7	1	1	0.0058	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1737
PBANKA_070390	1	35542.9	1	1	0.0652	Plasmodium berghei ANKA receptor for activated c kinase, putative (RACK) protein length=322
PBANKA_071930	1	68821.6	1	1	0.0375	Plasmodium berghei ANKA bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase, putative (DHFR-TS) protein length=587
PBANKA_072020	1	125020.1	1	1	0.0218	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=1057
PBANKA_080800	1	157950.9	1	1	0.0060	Plasmodium berghei ANKA cdc2-related protein kinase 4 (CRK4) protein length=1342
PBANKA_081300	1	39931.8	1	1	0.0876	Plasmodium berghei ANKA inhibitor of cysteine proteases (ICP) protein length=354
PBANKA_082470	1	71336.9	1	1	0.0343	Plasmodium berghei ANKA thioredoxin reductase, putative (TRXR) protein length=642
PBANKA_090650	1	14555	1	1	0.1111	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L28, putative protein length=126
PBANKA_091760	1	115942	1	1	0.0162	Plasmodium berghei ANKA structural maintenance of chromosome protein, putative, fragment protein length=986
PBANKA_100310	1	344141.6	1	1	0.0081	Plasmodium berghei ANKA pre-mRNA-processing-splicing factor 8, putative (PRPF8) protein length=2949
PBANKA_100720	1	135490.3	1	1	0.0205	Plasmodium berghei ANKA replication protein A1, large subunit, putative (RPA1) protein length=1170
PBANKA_100850	1	101867.1	1	1	0.0109	Plasmodium berghei ANKA translocon component PTEX150 (PTEX150) protein length=919
PBANKA_100880	1	68014.1	1	1	0.0222	Plasmodium berghei ANKA glucose-6-phosphate isomerase, putative protein length=586
PBANKA_101440	1	243062.6	1	1	0.0048	Plasmodium berghei ANKA acid phosphatase, putative protein length=2092
PBANKA_101490	1	145511.3	1	1	0.0223	Plasmodium berghei ANKA coatamer protein, beta subunit, putative protein length=1256
PBANKA_101860	1	18683.1	1	1	0.1056	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L21, putative (RPL21) protein length=161
PBANKA_102550	1	481536.3	1	1	0.0084	Plasmodium berghei ANKA NOT family protein, putative protein length=4169
PBANKA_102620	1	52927.9	1	1	0.0404	Plasmodium berghei ANKA NADP-specific glutamate dehydrogenase, putative (GDH1) protein length=470

PBANKA_102840	1	25212.2	1	1	0.1416	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L10, putative protein length=219
PBANKA_103230	1	85799.8	1	1	0.0185	Plasmodium berghei ANKA cytidine triphosphate synthetase, putative protein length=756
PBANKA_103520	1	148090.1	1	1	0.0184	Plasmodium berghei ANKA LCCL domain-containing protein (CCp3) protein length=1304
PBANKA_103790	1	18080.9	1	1	0.1806	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=155
PBANKA_110720	1	74962.5	1	1	0.0561	Plasmodium berghei ANKA cell differentiation protein, putative (CAF40) protein length=677
PBANKA_112430	1	43531.9	1	1	0.0780	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=372
PBANKA_114280	1	72969.3	1	1	0.0394	Plasmodium berghei ANKA conserved Plasmodium protein, unknown function protein length=634
PBANKA_114580	1	20338.1	1	1	0.0950	Plasmodium berghei ANKA conserved rodent malaria protein, unknown function protein length=179
PBANKA_120060	1	250881.9	1	1	0.0095	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=2206
PBANKA_121100	1	62632.9	1	1	0.0423	Plasmodium berghei ANKA GMP synthetase, putative (GMPS) protein length=544
PBANKA_121360	1	78310.1	1	1	0.0225	Plasmodium berghei ANKA cysteine--tRNA ligase, putative (CysRS) protein length=668
PBANKA_122900	1	126199.2	1	1	0.0183	Plasmodium berghei ANKA Plasmodium exported protein, unknown function protein length=1095
PBANKA_123180	1	18184.7	1	1	0.0848	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L12, putative protein length=165
PBANKA_123780	1	160818.7	1	1	0.0113	Plasmodium berghei ANKA multidrug resistance protein, putative (MDR1) protein length=1419
PBANKA_123990	1	76774.7	1	1	0.0193	Plasmodium berghei ANKA acyl-CoA synthetase, putative protein length=674
PBANKA_131080	1	29901.8	1	1	0.0627	Plasmodium berghei ANKA 40S ribosomal protein S5, putative protein length=271
PBANKA_131920	1	121418	1	1	0.0216	Plasmodium berghei ANKA AP-1 complex subunit gamma, putative protein length=1067
PBANKA_135190	1	26708.1	1	1	0.0823	Plasmodium berghei ANKA 60S ribosomal protein L6-2, putative protein length=231
PBANKA_135860	1	53688.7	1	1	0.0554	Plasmodium berghei ANKA isocitrate dehydrogenase (NADP), mitochondrial precursor, putative (IDH) protein length=469
PBANKA_140060	1	152048.9	1	1	0.0201	Plasmodium berghei ANKA cytoadherence linked asexual protein, putative protein length=1296
PBANKA_141030	1	123256.3	1	1	0.0141	Plasmodium berghei ANKA M1-family alanyl aminopeptidase, putative protein length=1064
PBANKA_142270	1	22536.2	1	1	0.1061	Plasmodium berghei ANKA superoxide dismutase [Fe], putative (FeSOD) protein length=198
PBANKA_143240	1	114257.2	1	1	0.0340	Plasmodium berghei ANKA perforin-like protein 2 (PLP2) protein length=999
PBANKA_145030	0	57830.3	1	1	0.0263	Plasmodium berghei ANKA ATP synthase subunit beta, mitochondrial, putative protein length=533

6. Conclusão

O presente trabalho é o primeiro estudo proteômico e fosfoproteômico em curso de tempo, em highthroughput, para estudar o desenvolvimento de gametas. Neste trabalho podemos observar a diversidade de processos celulares por que passa tanto o *Plasmodium* selvagem como o mutante em seguida do estímulo a produção de gametas.

Trazemos informações inéditas quanto aos efeitos fisiológicos da interrupção do gene da cinesina 8 e, portanto, a importância desta proteína motora para os dois processos por que passa o microgametócito para produção de gametas masculinos: diferenciação celular e replicação celular.

Temos que, em consequente a ingestão de sangue pelo mosquito, microgametócito tem 15-20 minutos para promover rápida transformação que produz 8 células microgâméticas a partir de cada microgametócito maduro para a fecundação do macrogameta e dar continuidade ao desenvolvimento sexuado e proliferação do parasita. Não obstante, a partir do presente estudo, podemos observar que a drástica transformação celular e condição fisiológica provocada por conjunto de proteínas que tiveram sua variação abundância inferior 90%. Certamente, a principal hipótese para rápidas mudanças de função e atividade de proteínas, quando não apoiada em diferença de abundância das proteínas e expressão de proteínas superior a 1,5 vezes, são as modificações pós-traducionais. Contudo, o parasita não apresenta proporção de proteínas fosforiladas muito diferente do que podemos encontrar em outros organismos como, a exemplo, humanos ou camundongos (Wu et al., 2009).

Outros estudos de proteômica usualmente seguem recomendações para que seja considerado diferenças de abundância de 1,5 ou 2 vezes para proteínas em análises de expressão diferencial entre condições metabólicas. Contudo, essa adoção poderia ser considerada arbitrária, sem muitos embasamentos objetivos, se não for levado em conta a o tempo disponível para a síntese proteica para o plasmódio, como também a sua capacidade de replicação do material genético em elevada velocidade. Mesmo a variação de volume de 30% proteínas transcricionais podem acarretar em alterações funcionais e fenotípicas relevantes, a exemplo das drásticas alterações morfológicas e fisiológicas por que passam o *Plasmodium*. Importantes alterações fenotípicas e funcionais são observáveis em *P. berghei* ao longo da replicação e diferenciação celular apesar de número reduzido de proteínas ter variação de

abundancia inferior a 50% na e nenhuma alcançar os valores de corte sugeridos por trabalhos de proteômica de 1,5 ou 2 vezes.

O presente estudo com *P. berghei* selvagem aponta que cerca de 12% de todas as proteínas identificadas nas três etapas de diferenciação estão associados à resposta ao estresse, metabolismo energético, biossíntese de macromoléculas e dobramento (anabolismo), e de defesa contra o hospedeiro. Eles representam os mecanismos mais ativos utilizados por *P. berghei* na sua diferenciação exigidos para a rápida alternância do ciclo de vida do parasita da malária, multiplicação rápida e diferenciação celular (Kooij et al., 2006), com reorganização celular e controle da expressão gênica. A produção de gametas férteis é uma etapa crítica para a continuidade dos ciclos de vida do parasita da malária.

Confirmamos que a glicólise é a principal via energética do desenvolvimento sexuado e a resposta ao estresse ambiental e proeminente principalmente no início da transformação. Gametócitos são como atletas em bloco de largada, em que todos os atores como mRNA, proteínas, material para trocas energéticas estão prontos para permitir um desempenho excepcional pelo organismo a fim de se transformar em gametas em curto intervalo de tempo.

A ausência na cinesina 8 torna as células sexuais com larga diferença em sua composição proteômica já a partir do estágio de gametócito e, em seguida ao estímulo para produção de gametas, a desorganização de microtúbulos. A estrutura citoesquelética desorganizada provoca alterações de diversos processos moleculares no metabolismo energético, empacotamento de DNA e síntese proteica, o que torna a célula mutante fisiologicamente distinta da célula selvagem a cada etapa analisada e incompetente para fecundação do zigoto.

Em síntese, apesar do curto período de tempo para a biossíntese de proteínas e de DNA, e a variação relativa perceptual estreita de proteínas, gametócitos foram sujeitos a uma transformação radical do microgametócito e menos radical do macrogametócitos quanto a morfologia. Todas as proteínas com abundância diferencial relativa aqui detectadas durante todo o processo de diferenciação convergem para uma condição fisiológica particular que permitam a replicação celular, além das possíveis três respostas celulares a distintos estados fisiológicos observados em transcriptoma de parasitas que infectam humanos: resposta estarvação, glicolíticas como via energética principal e resposta ao estresse ambiental (Pallavi et al., 2010).

Proteínas com elevada taxa de reciclagem mas também de síntese não seria detectada e, portanto, considerada como de primeira importância para o processo de diferenciação por nossa abordagem. Experiências adicionais teriam de ser levada a cabo para explorar melhor a relação entre expressão de proteínas e reciclagem para o presente sistema biológico.

Perspectivas e sugestão para novos trabalhos

Embora um progresso considerável tem sido feito na compreensão da gametogênese, abordagens proteômicas e phosphoproteômicas fornecem informações que as tornam complementares a outros estudos e, portanto adequadas para investigar os eventos celulares durante este curto transformação. Estas abordagens podem ser combinadas com abordagens de metabolômica e lipidômica para estudo dos mensageiros de vias combinados a abordagens de manipulação genética para exclusão de genes envolvidos na organização flagelar afim de melhor estudar a exflagelação.

Passo importante para a ampliação do conhecimento sobre a biologia do parasita está no desenvolvimento de técnica que permita a separação das células sexuais masculinas das femininas. A superação do desafio separação das populações permitiria tanto reduzir a complexidade da amostra a ser estudada como na redução de variáveis experimentais e de *bystander effect* nos estímulos celulares.

Experimentos de imunocitocalização das proteínas motoras ao longo da análise em curso de tempo como microscopia de fluorescência confocal, microscopia eletrônica, assim como aplicação de técnicas de enriquecimento de complexos podem trazer informações importantes para a formação do corpo de conhecimento da biologia reprodutiva do parasita da malária.

7. Bibliografia

- Acabado, A.M. (1900). *Breve estudo sobre o Paludismo*. Escola Medico-Cirurgica do Porto.
- Acharya, P., Kumar, R., and Tatu, U. (2007). Chaperoning a cellular upheaval in malaria: heat shock proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 153, 85-94.
- Aebersold, R., Hood, L.E., and Watts, J.D. (2000). Equipping scientists for the new biology. *Nature Biotechnology* 18, 359-359.
- Aguilar, R., Magallon-Tejada, A., Achtman, A.H., Moraleda, C., Joice, R., Cistero, P., Li Wai Suen, C.S., Nhabomba, A., Macete, E., Mueller, I., Marti, M., Alonso, P.L., Menendez, C., Schofield, L., and Mayor, A. (2014). Molecular evidence for the localization of *Plasmodium falciparum* immature gametocytes in bone marrow. *Blood* 123, 959-966.
- Alano, P. (2007). *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol Microbiol* 66, 291-302.
- Alano, P. (2014). The sound of sexual commitment breaks the silencing of malaria parasites. *Trends Parasitol* 30, 509-510.
- Alonso-Morales, A., Gonzalez-Lopez, L., Cazares-Raga, F.E., Cortes-Martinez, L., Torres-Monzon, J.A., Gallegos-Perez, J.L., Rodriguez, M.H., James, A.A., and Hernandez-Hernandez Fde, L. (2015). Protein phosphorylation during *Plasmodium berghei* gametogenesis. *Exp Parasitol* 156, 49-60.
- Alvares, M.G.D.A. (1909). *A Esplenomegalia Palustre*. Escola Medico-Cirurgica do Porto.
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., and Menard, R. (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* 12, 220-224.
- Ansari, A., and Tuteja, R. (2012). Genome wide comparative comprehensive analysis of *Plasmodium falciparum* MCM family with human host. *Commun Integr Biol* 5, 607-615.
- Arevalo-Herrera, M., Solarte, Y., Marin, C., Santos, M., Castellanos, J., Beier, J.C., and Valencia, S.H. (2011). Malaria transmission blocking immunity and sexual stage vaccines for interrupting malaria transmission in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 Suppl 1, 202-211.
- Assembly, N.P. (1902). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1902 - Ronald Ross* [Online]. Available: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1902/ [Accessed December 2015].
- Assembly, N.P. (1907). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1907 - Charles Louis Alphonse Laveran* [Online]. Available: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1907/ [Accessed December 2015].
- Assembly, N.P. (1927). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1927 - Julius Wagner-Jauregg* [Online]. Available: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1927/ [Accessed December 2015].
- Assembly, N.P. (1948). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1948 - Paul Hermann Müller* [Online]. Available: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1948/ [Accessed].
- Assembly, N.P. (2015). "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2015".
- Bafort, J., Timperman, G., and Delbar, T. (1968). Observations on tissue schizogony and sporogony of rodent malaria. *Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol* 48, 535-540.
- Baker, D.A. (2010). Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 172, 57-65.
- Bannister, L., and Mitchell, G. (2003). The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol* 19, 209-213.
- Barrett, M.P. (1997). The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitol Today* 13, 11-16.
- Bartosova-Sojkova, P., Oppenheim, R.D., Soldati-Favre, D., and Lukes, J. (2015). Epicellular Apicomplexans: Parasites "On the Way In". *PLoS Pathog* 11, e1005080.
- Bastianelli, G. (1948). Exo-erythrocytic forms of malaria parasite. *Br Med J* 1, 520.

- Baum, J., Gilberger, T.W., Frischknecht, F., and Meissner, M. (2008). Host-cell invasion by malaria parasites: insights from Plasmodium and Toxoplasma. *Trends Parasitol* 24, 557-563.
- Baum, J., Papenfuss, A.T., Baum, B., Speed, T.P., and Cowman, A.F. (2006). Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat Rev Microbiol* 4, 621-628.
- Bautista, J.M., Marin-Garcia, P., Diez, A., Azcarate, I.G., and Puyet, A. (2014). Malaria proteomics: insights into the parasite-host interactions in the pathogenic space. *J Proteomics* 97, 107-125.
- Bbc (2014). "The malaria mines of Venezuela".
- Beauchamp, C. (1988). Fièvres d'hier, paludisme d'aujourd'hui. Vie et mort d'une maladie. *Annales. Économies, Sociétés, Civilisations* 43^e année, 6.
- Beetsma, A.L., Van De Wiel, T.J., Sauerwein, R.W., and Eling, W.M. (1998). Plasmodium berghei ANKA: purification of large numbers of infectious gametocytes. *Exp Parasitol* 88, 69-72.
- Behrens, R.H., Neave, P.E., and Jones, C.O. (2015). Imported malaria among people who travel to visit friends and relatives: is current UK policy effective or does it need a strategic change? *Malar J* 14, 149.
- Bell, A. (1998). Microtubule inhibitors as potential antimalarial agents. *Parasitol Today* 14, 234-240.
- Benchimol, J.L. (2000). A instituição da microbiologia e a história da saúde pública no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva* 5, 265-292.
- Benchimol, J.L., and Sá, M.R. (2005). *Adolpho Lutz - Febre amarela, malária e protozoologia*. Editora FIOCRUZ.
- Berger, S.L. (2010). Cell signaling and transcriptional regulation via histone phosphorylation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75, 23-26.
- Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B., and Brinkmann, V. (2004). Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* 117, 503-514.
- Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A.E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R.E., and Morris, H.R. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* 392, 289-292.
- Billker, O., Shaw, M.K., Margos, G., and Sinden, R.E. (1997). The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of Plasmodium berghei in vitro. *Parasitology* 115 (Pt 1), 1-7.
- Boisson, B., Lacroix, C., Bischoff, E., Gueirard, P., Bargieri, D.Y., Franke-Fayard, B., Janse, C.J., Menard, R., and Baldacci, P. (2011). The novel putative transporter NPT1 plays a critical role in early stages of Plasmodium berghei sexual development. *Mol Microbiol* 81, 1343-1357.
- Boudin, J.C.M.F.J. (1842). *Traité des fièvres intermittentes, rémittentes et continues, des pays chauds et des contrées marécageuses; suivi de Recherches sur l'emploi thérapeutique des préparations arsénicales*. Paris: Germer-Baillière.
- Bourel-Roncière (1872). *La station navale du Bresil et de la plata*. Paris: J.-B. Baillière.
- Bousema, T., and Drakeley, C. (2011). Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev* 24, 377-410.
- Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B.L., Wong, E.D., Zhu, J., and Derisi, J.L. (2003). The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum. *PLoS Biol* 1, E5.
- Briquet, S., Lawson-Hogban, N., Boisson, B., Soares, M.P., Péronet, R., Smith, L., Ménard, R., Huerre, M., Mécheri, S., Vaquero, C., and Adams, J.H. (2015). Disruption of Parasitehmg2Gene Attenuates Plasmodium berghei ANKA Pathogenicity. *Infection and Immunity* 83, 2771-2784.
- Bruce, M.C., Alano, P., Duthie, S., and Carter, R. (1990). Commitment of the malaria parasite Plasmodium falciparum to sexual and asexual development. *Parasitology* 100 Pt 2, 191-200.
- Bunnik, E.M., and Le Roch, K.G. (2015). PfAlba1: master regulator of translation in the malaria parasite. *Genome Biol* 16, 221.
- Carlton, J.M., Angiuoli, S.V., Suh, B.B., Kooij, T.W., Pertea, M., Silva, J.C., Ermolaeva, M.D., Allen, J.E., Selengut, J.D., Koo, H.L., Peterson, J.D., Pop, M., Kosack, D.S., Shumway, M.F., Bidwell, S.L., Shallom, S.J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S.B., Feldblyum, T.V., Cho, J.K., Quackenbush, J., Sedegah, M., Shoabibi, A., Cummings, L.M., Florens, L., Yates, J.R., Raine,

- J.D., Sinden, R.E., Harris, M.A., Cunningham, D.A., Preiser, P.R., Bergman, L.W., Vaidya, A.B., Van Lin, L.H., Janse, C.J., Waters, A.P., Smith, H.O., White, O.R., Salzberg, S.L., Venter, J.C., Fraser, C.M., Hoffman, S.L., Gardner, M.J., and Carucci, D.J. (2002). Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* 419, 512-519.
- Carter, R., and Graves, P. (1989). "Gametocytes," in *Malaria: Principles and Practice of Malariology*, eds. W.H. Wernsdorfer & I.A. McGregor. Churchill Livingstone), 2092.
- Carter, R., and Miller, L.H. (1979). Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* in continuous culture. *Bull World Health Organ* 57 Suppl 1, 37-52.
- Carvalho, P.C., Lima, D.B., Leprevost, F.V., Santos, M.D., Fischer, J.S., Aquino, P.F., Moresco, J.J., Yates, J.R., 3rd, and Barbosa, V.C. (2016). Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc* 11, 102-117.
- Casadevall, A., and Fang, F.C. (2008). Descriptive Science. *Infection and Immunity* 76, 3835-3836.
- Castanheira, H.G. (1885). *Do Diagnóstico e Tratamento da Pyrexias Palustres*. Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.
- Cavalier-Smith, T. (1999). Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Eukaryot Microbiol* 46, 347-366.
- Cavalier-Smith, T. (2010). Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biology Letters* 6, 342-345.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Muller, H.M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., Von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., and Kafatos, F.C. (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 159-165.
- Chung, D.W., Ponts, N., Cervantes, S., and Le Roch, K.G. (2009). Post-translational modifications in *Plasmodium*: more than you think! *Mol Biochem Parasitol* 168, 123-134.
- Chung, D.W., Ponts, N., Prudhomme, J., Rodrigues, E.M., and Le Roch, K.G. (2012). Characterization of the ubiquitylating components of the human malaria parasite's protein degradation pathway. *PLoS One* 7, e43477.
- Cnrpalu (2010). "Rapport annuel d'activité 2010". (Centre de national de référence du Paludisme).
- Cnrpalu (2011). "Rapport annuel d'activité 2011". (Centre de national de référence du Paludisme).
- Cnrpalu (2012). "Rapport annuel d'activité 2012". (Centre de national de référence du Paludisme).
- Cnrpalu (2013). "Rapport annuel d'activité 2013". (Centre de national de référence du Paludisme).
- Cnrpalu (2014). "Rapport annuel d'activité 2014". (Centre de national de référence du Paludisme).
- Cnrpalu (2015a). "Rapport annuel d'activité 2015". (Centre de national de référence du Paludisme).
- Cnrpalu, C.N.D.R.D.P. (2015b). *Paludisme* [Online]. Available: <http://www.cnrpalu-france.org> [Accessed Decembre 2015].
- Coatney, G.R., Chin, W., Contacos, P.G., and King, H.K. (1966). *Plasmodium inui*, a quartan-type malaria parasite of Old World monkeys transmissible to man. *J Parasitol* 52, 660-663.
- Colin, L. (1870). *Traité des fièvres intermittentes, par Léon Colin*. Paris: J.-B. Baillière.
- Contacos, P.G., Lunn, J.S., Coatney, G.R., Kilpatrick, J.W., and Jones, F.E. (1963). Quartan-Type Malaria Parasite of New World Monkeys Transmissible to Man. *Science* 142, 676.
- Coppi, A., Tewari, R., Bishop, J.R., Bennett, B.L., Lawrence, R., Esko, J.D., Billker, O., and Sinnis, P. (2007). Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host Microbe* 2, 316-327.
- Corre, A. (1887). *Traité clinique des maladies des pays chauds*. Paris: Octave Doin.
- Corrêa, M.O.A. (1955). Adolfo Lutz, protozoologista. *revistas bvs* 15, 39-56.
- Costa, D.D.a.M. (1885). *A malaria e suas diversas modalidades clínicas*. Lombaerts.
- Cottet, R. (1962). "La lutte contre le paludisme". (Paris: La Poste).
- Cox, F.E. (2010a). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors* 3, 5.

- Cox, F.E.G. (2010b). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors* 3, 5-5.
- Cox, J., and Mann, M. (2007). Is proteomics the new genomics? *Cell* 130, 395-398.
- Dastidar, E.G., Dzeyk, K., Krijgsveld, J., Malmquist, N.A., Doerig, C., Scherf, A., and Lopez-Rubio, J.J. (2013). Comprehensive histone phosphorylation analysis and identification of Pf14-3-3 protein as a histone H3 phosphorylation reader in malaria parasites. *PLoS One* 8, e53179.
- De Castro Souza, L.U. (1972). *A medicina na guerra do Paraguai*. Revista de História.
- De Koning-Ward, T.F., Olivieri, A., Bertuccini, L., Hood, A., Silvestrini, F., Charvalias, K., Berzosa Diaz, P., Camarda, G., Mcelwain, T.F., Papenfuss, T., Healer, J., Baldassarri, L., Crabb, B.S., Alano, P., and Ranford-Cartwright, L.C. (2008). The role of osmiophilic bodies and Pfg377 expression in female gametocyte emergence and mosquito infectivity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 67, 278-290.
- De Koning-Ward, T.F., Thomas, A.W., Waters, A.P., and Janse, C.J. (1998). Stable expression of green fluorescent protein in blood and mosquito stages of *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol* 97, 247-252.
- Deligianni, E., Morgan, R.N., Bertuccini, L., Kooij, T.W., Laforge, A., Nahar, C., Poulakakis, N., Schuler, H., Louis, C., Matuschewski, K., and Siden-Kiamos, I. (2011). Critical role for a stage-specific actin in male exflagellation of the malaria parasite. *Cell Microbiol* 13, 1714-1730.
- Doerig, C., Baker, D., Billker, O., Blackman, M.J., Chitnis, C., Dhar Kumar, S., Heussler, V., Holder, A.A., Kocken, C., Krishna, S., Langsley, G., Lasonder, E., Menard, R., Meissner, M., Pradel, G., Ranford-Cartwright, L., Sharma, A., Sharma, P., Tardieux, T., Tatu, U., and Alano, P. (2009). Signalling in malaria parasites. The MALSIG consortium. *Parasite* 16, 169-182.
- Doerig, C., Billker, O., Haystead, T., Sharma, P., Tobin, A.B., and Waters, N.C. (2008). Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends Parasitol* 24, 570-577.
- Dong, Y., Aguilar, R., Xi, Z., Warr, E., Mongin, E., and Dimopoulos, G. (2006). Anopheles gambiae immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog* 2, e52.
- Duffy, M.F., Selvarajah, S.A., Josling, G.A., and Petter, M. (2012). The role of chromatin in *Plasmodium* gene expression. *Cell Microbiol* 14, 819-828.
- Dunyo, S., Milligan, P., Edwards, T., Sutherland, C., Targett, G., and Pinder, M. (2006). Gametocytaemia after drug treatment of asymptomatic *Plasmodium falciparum*. *PLoS Clin Trials* 1, e20.
- Eyrich, B., Sickmann, A., and Zahedi, R.P. (2011). Catch me if you can: mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies. *Proteomics* 11, 554-570.
- Fanica, P.-O. (2006). La disparition du paludisme dans la France rurale et la régression des terres humides : exemple de la Sologne. *Etude et Gestion des Sols* 13, 8.
- Fapesp (2014). *A malária já não é uma doença negligenciada* [Online]. Available: http://agencia.fapesp.br/a_malaria_ja_nao_e_uma_doenca_negligenciada/19241 [Accessed].
- Feder, M.E., and Hofmann, G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61, 243-282.
- Fennell, B.J., Al-Shatr, Z.A., and Bell, A. (2008). Isotype expression, post-translational modification and stage-dependent production of tubulins in erythrocytic *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 38, 527-539.
- Feynman, R.P. (2005). *The Meaning of it All: Thoughts of a Citizen Scientist*. Basic Books.
- Figueiredo, L.T.M.U.H.W.S.B.S.P.S.S.A., Pid=S, and Nrm=Iso (1996). A febre amarela na região de Ribeirão Preto durante a virada do século XIX: importância científica e repercussões econômicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 29, 63-76.
- Flanagan J. P., L.M.A. (1970). Controlled phenylhydrazine-induced reticulocytosis in the rat. *The Ohio journal of science* 70, 5.
- Flannery, E.L., Chatterjee, A.K., and Winzeler, E.A. (2013). Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. *Nat Rev Microbiol* 11, 849-862.
- Florens, L., Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., Moch, J.K., Muster, N., Sacci, J.B., Tabb, D.L., Witney, A.A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M.J., Holder,

- A.A., Sinden, R.E., Yates, J.R., and Carucci, D.J. (2002a). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419, 520-526.
- Florens, L., Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., Moch, J.K., Muster, N., Sacci, J.B., Tabb, D.L., Witney, A.A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M.J., Holder, A.A., Sinden, R.E., Yates, J.R., and Carucci, D.J. (2002b). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419, 520-526.
- Fonseca, F., Cambournac, J.C., and Et Al. (1946). Studies on the exo-erythrocytic cycle of malaria. *Parasitology* 37, 113-117.
- Fontana, R. (2005). *As obras dos engenheiros militares Galluzzi e Sambuceti e do arquiteto Landi no Brasil colonial do século XVIII*. Brasilia: Senado Federal.
- Foth, B.J., and Mcfadden, G.I. (2003). The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol* 224, 57-110.
- Fourest-Lieuvin, A. (2005). Microtubule Regulation in Mitosis: Tubulin Phosphorylation by the Cyclin-dependent Kinase Cdk1. *Molecular Biology of the Cell* 17, 1041-1050.
- Fourest-Lieuvin, A., Peris, L., Gache, V., Garcia-Saez, I., Juillan-Binard, C., Lantez, V., and Job, D. (2006). Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell* 17, 1041-1050.
- Fox, L.A., Sawin, K.E., and Sale, W.S. (1994). Kinesin-related proteins in eukaryotic flagella. *J Cell Sci* 107 (Pt 6), 1545-1550.
- Franke-Fayard, B., Trueman, H., Ramesar, J., Mendoza, J., Van Der Keur, M., Van Der Linden, R., Sinden, R.E., Waters, A.P., and Janse, C.J. (2004). A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 137, 23-33.
- Freire, D. (1892). Physiologie Pathologique sur l'origine bacterienne de la fièvre bilieuse des pays chaud. *Gazette Medicale de Paris* 42, 2.
- Frevert, U., Engelmann, S., Zougbede, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L., and Yee, H. (2005). Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol* 3, e192.
- Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thiberge, S., Olivo-Marin, J.C., Shorte, S.L., and Menard, R. (2004). Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. *Cell Microbiol* 6, 687-694.
- Frontière, M.D.S. (2001). Fatal Imbalance - The Crisis in Research and Development for Drugs for Neglected Diseases. *Essential Medicines Campaign and the Drugs for Neglected Diseases*.
- Garcia, C.H.S., Depoix, D., Queiroz, R.M.L., Souza, J.M.F., Fontes, W., Sousa, M.V.D., Santos, M.D.M., Carvalho, P.C., Grellier, P., and Charneau, S. (Submitted). Quantitative Proteomic and Phosphoproteomic Analysis within *Plasmodium berghei* gametogenesis.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M.A., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., Mcfadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., and Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498-511.
- Garnham, P.C. (1965). The structure of early sporogonic stages of *Plasmodium berghei*. *Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol* 45, 259-264.
- Gerald, N., Mahajan, B., and Kumar, S. (2011). Mitosis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* 10, 474-482.
- Gerber, J.E., Ukena, T.E., Cote, L., Wyllie, J.M., and Winn, W.C., Jr. (1981). Exflagellation of malarial parasites in human peripheral blood. *J Clin Microbiol* 13, 236-237.
- Gergely, Z.R., Crapo, A., Hough, L.E., Mcintosh, J.R., and Betterton, M.D. (2016). Kinesin-8 effects on mitotic microtubule dynamics contribute to spindle function in fission yeast. *Mol Biol Cell*.
- Ghosh, A.K., and Jacobs-Lorena, M. (2013). In Vitro Differentiation of *Plasmodium falciparum* Gametocytes into Ookinetes. *Methods Mol Biol* 923, 27-33.

- Gill, J., Kumar, A., Yogavel, M., Belrhali, H., Jain, S.K., Rug, M., Brown, M., Maier, A.G., and Sharma, A. (2010). Structure, localization and histone binding properties of nuclear-associated nucleosome assembly protein from *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 9, 90.
- Gindhart, J.G. (2006). Towards an understanding of kinesin-1 dependent transport pathways through the study of protein-protein interactions. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5, 74-86.
- Gobom, J., Nordhoff, E., Mirgorodskaya, E., Ekman, R., and Roepstorff, P. (1999). Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 34, 105-116.
- Gorzoni, M.L., Pires, S.L., and Faria, L.D.F.C. (2010). Temperatura basal em idosos asilados. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia* 13, 173-178.
- Goyal, M., Alam, A., Iqbal, M.S., Dey, S., Bindu, S., Pal, C., Banerjee, A., Chakrabarti, S., and Bandyopadhyay, U. (2012). Identification and molecular characterization of an Alba-family protein from human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res* 40, 1174-1190.
- Goyal, M., Banerjee, C., Nag, S., and Bandyopadhyay, U. (2016). The Alba protein family: Structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1864, 570-583.
- Graewe, S., Stanway, R.R., Rennenberg, A., and Heussler, V.T. (2012). Chronicle of a death foretold: *Plasmodium* liver stage parasites decide on the fate of the host cell. *FEMS Microbiol Rev* 36, 111-130.
- Gueirard, P., Tavares, J., Thiberge, S., Bernex, F., Ishino, T., Milon, G., Franke-Fayard, B., Janse, C.J., Menard, R., and Amino, R. (2010). Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18640-18645.
- Gupta, M.L., Jr., Carvalho, P., Roof, D.M., and Pellman, D. (2006). Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. *Nat Cell Biol* 8, 913-923.
- Guttery, D.S., Ferguson, D.J., Poulin, B., Xu, Z., Straschil, U., Klop, O., Solyakov, L., Sandrini, S.M., Brady, D., Nieduszynski, C.A., Janse, C.J., Holder, A.A., Tobin, A.B., and Tewari, R. (2012a). A putative homologue of CDC20/CDH1 in the malaria parasite is essential for male gamete development. *PLoS Pathog* 8, e1002554.
- Guttery, D.S., Holder, A.A., and Tewari, R. (2012b). Sexual development in *Plasmodium*: lessons from functional analyses. *PLoS Pathog* 8, e1002404.
- Guttery, D.S., Poulin, B., Ramaprasad, A., Wall, R.J., Ferguson, D.J., Brady, D., Patzewitz, E.M., Whipple, S., Straschil, U., Wright, M.H., Mohamed, A.M., Radhakrishnan, A., Arold, S.T., Tate, E.W., Holder, A.A., Wickstead, B., Pain, A., and Tewari, R. (2014). Genome-wide functional analysis of *Plasmodium* protein phosphatases reveals key regulators of parasite development and differentiation. *Cell Host Microbe* 16, 128-140.
- Guttery, D.S., Roques, M., Holder, A.A., and Tewari, R. (2015). Commit and Transmit: Molecular Players in *Plasmodium* Sexual Development and Zygote Differentiation. *Trends Parasitol* 31, 676-685.
- Hall, C.I., Reese, M.L., Weerapana, E., Child, M.A., Bowyer, P.W., Albrow, V.E., Haraldsen, J.D., Phillips, M.R., Sandoval, E.D., Ward, G.E., Cravatt, B.F., Boothroyd, J.C., and Bogoy, M. (2011). Chemical genetic screen identifies *Toxoplasma* DJ-1 as a regulator of parasite secretion, attachment, and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10568-10573.
- Hall, N., Karras, M., Raine, J.D., Carlton, J.M., Kooij, T.W., Berriman, M., Florens, L., Janssen, C.S., Pain, A., Christophides, G.K., James, K., Rutherford, K., Harris, B., Harris, D., Churcher, C., Quail, M.A., Ormond, D., Doggett, J., Trueman, H.E., Mendoza, J., Bidwell, S.L., Rajandream, M.A., Carucci, D.J., Yates, J.R., 3rd, Kafatos, F.C., Janse, C.J., Barrell, B., Turner, C.M., Waters, A.P., and Sinden, R.E. (2005). A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* 307, 82-86.
- Hanks, S.K. (2003). Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol* 4, 111.
- Harbut, M.B., Patel, B.A., Yeung, B.K., Mcnamara, C.W., Bright, A.T., Ballard, J., Supek, F., Golde, T.E., Winzeler, E.A., Diagana, T.T., and Greenbaum, D.C. (2012). Targeting the ERAD

- pathway via inhibition of signal peptide peptidase for antiparasitic therapeutic design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 21486-21491.
- Heppner, D.G. (2013). The malaria vaccine – Status quo 2013. *Travel Medicine and Infectious Disease* 11, 2-7.
- Hilger, M., Bonaldi, T., Gnad, F., and Mann, M. (2009). Systems-wide analysis of a phosphatase knock-down by quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics* 8, 1908-1920.
- Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., Van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C., and Haldar, K. (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 306.
- Hillyer, J.F., Barreau, C., and Vernick, K.D. (2007). Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *Int J Parasitol* 37, 673-681.
- Hirai, M., Arai, M., Kawai, S., and Matsuoka, H. (2006). PbGCbeta is essential for Plasmodium ookinete motility to invade midgut cell and for successful completion of parasite life cycle in mosquitoes. *J Biochem* 140, 747-757.
- Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 311-322.
- Hirokawa, N., and Noda, Y. (2008). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* 88, 1089-1118.
- Hliscs, M., Millet, C., Dixon, M.W., Siden-Kiamos, I., Mcmillan, P., and Tilley, L. (2015). Organization and function of an actin cytoskeleton in Plasmodium falciparum gametocytes. *Cellular Microbiology* 17, 207-225.
- Houzeau, A.E. (1874-1889). *Dictionnaire encyclopédique des sciences médicales*. Paris: Masson.
- Jacot, D., Waller, R.F., Soldati-Favre, D., Macpherson, D.A., and Macrae, J.I. (2016). Apicomplexan Energy Metabolism: Carbon Source Promiscuity and the Quiescence Hyperbole. *Trends Parasitol* 32, 56-70.
- Jambou, R., El-Assaad, F., Combes, V., and Grau, G.E. (2011). In vitro culture of Plasmodium berghei-ANKA maintains infectivity of mouse erythrocytes inducing cerebral malaria. *Malar J* 10, 346.
- Janse, C.J., Ponnudurai, T., Lensen, A.H., Meuwissen, J.H., Ramesar, J., Van Der Ploeg, M., and Overdulve, J.P. (1988). DNA synthesis in gametocytes of Plasmodium falciparum. *Parasitology* 96 (Pt 1), 1-7.
- Janse, C.J., Ramesar, J., and Waters, A.P. (2006). High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite Plasmodium berghei. *Nat Protoc* 1, 346-356.
- Janse, C.J., Van Der Klooster, P.F., Van Der Kaay, H.J., Van Der Ploeg, M., and Overdulve, J.P. (1986). Rapid repeated DNA replication during microgametogenesis and DNA synthesis in young zygotes of Plasmodium berghei. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80, 154-157.
- Janse, C.J., and Water, A.P. (2004). "Sexual development of malaria parasites," in *Malaria parasites: genomes and molecular biology*, eds. A.P. Water & C.J. Janse. (Leiden: Caister Academic Press).
- Jayabalasingham, B., Bano, N., and Coppens, I. (2010). Metamorphosis of the malaria parasite in the liver is associated with organelle clearance. *Cell Res* 20, 1043-1059.
- Jelinska, C., Conroy, M.J., Craven, C.J., Hounslow, A.M., Bullough, P.A., Waltho, J.P., Taylor, G.L., and White, M.F. (2005). Obligate heterodimerization of the archaeal Alba2 protein with Alba1 provides a mechanism for control of DNA packaging. *Structure* 13, 963-971.
- Jensen, S.S., and Larsen, M.R. (2007). Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 3635-3645.
- Johnson, K.A., and Rosenbaum, J.L. (1992). Polarity of flagellar assembly in Chlamydomonas. *J Cell Biol* 119, 1605-1611.
- Jones, P.M., Robinson, M.W., Dalton, J.P., and George, A.M. (2011). The Plasmodium falciparum malaria M1 alanyl aminopeptidase (PfA-M1): insights of catalytic mechanism and function from MD simulations. *PLoS One* 6, e28589.

- Josling, G.A., and Llinas, M. (2015). Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol* 13, 573-587.
- Kalanon, M., and Mcfadden, G.I. (2010). Malaria, Plasmodium falciparum and its apicoplast. *Biochem Soc Trans* 38, 775-782.
- Kanaani, J., and Ginsburg, H. (1991). Transport of lactate in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes. *J Cell Physiol* 149, 469-476.
- Kanehisa, M., and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28, 27-30.
- Kardon, J.R., and Vale, R.D. (2009). Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 854-865.
- Kato, K. (2016). Evaluation of the enzyme activity of protozoan protein kinases by using an in vitro kinase assay. *Parasitol Int* 65, 510-513.
- Kawamoto, F., Alejo-Blanco, R., Fleck, S.L., Kawamoto, Y., and Sinden, R.E. (1990). Possible roles of Ca²⁺ and cGMP as mediators of the exflagellation of Plasmodium berghei and Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 42, 101-108.
- Kawamoto, F., Fujioka, H., Murakami, R., Syafruddin, Hagiwara, M., Ishikawa, T., and Hidaka, H. (1993). The roles of Ca²⁺/calmodulin- and cGMP-dependent pathways in gametogenesis of a rodent malaria parasite, Plasmodium berghei. *Eur J Cell Biol* 60, 101-107.
- Ke, H., Lewis, I.A., Morrissey, J.M., Mclean, K.J., Ganesan, S.M., Painter, H.J., Mather, M.W., Jacobs-Lorena, M., Llinas, M., and Vaidya, A.B. (2015). Genetic investigation of tricarboxylic acid metabolism during the Plasmodium falciparum life cycle. *Cell Rep* 11, 164-174.
- Keating, C. (2014). Ken Warren and the Rockefeller Foundation's great neglected diseases network, 1978-1988: the transformation of tropical and global medicine. *Mol Med* 20 Suppl 1, S24-30.
- Keeling, P.J. (2009). Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis. *J Eukaryot Microbiol* 56, 1-8.
- Kehrer, J., Frischknecht, F., and Mair, G.R. (2016). Proteomic Analysis of the Plasmodium berghei Gametocyte Egressome and Vesicular bioID of Osmiophilic Body Proteins Identifies Merozoite TRAP-like Protein (MTRAP) as an Essential Factor for Parasite Transmission. *Mol Cell Proteomics* 15, 2852-2862.
- Kell, D.B., and Oliver, S.G. (2004). Here is the evidence, now what is the hypothesis? The complementary roles of inductive and hypothesis-driven science in the post-genomic era. *BioEssays* 26, 99-105.
- Kevenaar, J.T., Bianchi, S., Van Spronsen, M., Olieric, N., Lipka, J., Frias, C.P., Mikhaylova, M., Harterink, M., Keijzer, N., Wulf, P.S., Hilbert, M., Kapitein, L.C., De Graaff, E., Ahkmanova, A., Steinmetz, M.O., and Hoogenraad, C.C. (2016). Kinesin-Binding Protein Controls Microtubule Dynamics and Cargo Trafficking by Regulating Kinesin Motor Activity. *Curr Biol* 26, 849-861.
- Khan, S.M., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Lasonder, E., Janse, C.J., Mann, M., and Waters, A.P. (2005). Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific Plasmodium biology. *Cell* 121, 675-687.
- Killick-Kendrick, R. (2012). "Taxonomy, zoogeography and evolution " in *Rodent Malaria*, ed. Killick-Kendrick. Elsevier), 432.
- King, A.F.A. (1883). Insects and Disease - Mosquitoes and Malaria. *Popular Science Monthly* 23, 644-658.
- Kogan, G.L., and Gvozdev, V.A. (2014). Multifunctional nascent polypeptide-associated complex (NAC). *Molecular Biology* 48, 189-196.
- Kooij, T.W., Franke-Fayard, B., Renz, J., Kroeze, H., Van Dooren, M.W., Ramesar, J., Augustijn, K.D., Janse, C.J., and Waters, A.P. (2005). Plasmodium berghei alpha-tubulin II: a role in both male gamete formation and asexual blood stages. *Mol Biochem Parasitol* 144, 16-26.
- Kooij, T.W., Janse, C.J., and Waters, A.P. (2006). Plasmodium post-genomics: better the bug you know? *Nat Rev Microbiol* 4, 344-357.
- Kovarova, J., and Barrett, M.P. (2016). The Pentose Phosphate Pathway in Parasitic Trypanosomatids. *Trends Parasitol.*
- Kreier, J.P.U. (2012). *Parasitic Protozoa: Babesia and Plasmodia*. Elsevier Science.

- Kruger, N.J., and Von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr Opin Plant Biol* 6, 236-246.
- Kuehn, A., and Pradel, G. (2010). The coming-out of malaria gametocytes. *J Biomed Biotechnol* 2010, 976827.
- Kulathu, Y., and Komander, D. (2012). Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 508-523.
- Kumar, C., and Mann, M. (2009). Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. *FEBS Lett* 583, 1703-1712.
- Kursula, I., Kursula, P., Ganter, M., Panjekar, S., Matuschewski, K., and Schuler, H. (2008). Structural basis for parasite-specific functions of the divergent profilin of *Plasmodium falciparum*. *Structure* 16, 1638-1648.
- Kwiatkowski, D.P. (2005). How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* 77, 171-192.
- Lalremruata, A., Magris, M., Vivas-Martinez, S., Koehler, M., Esen, M., Kempaiah, P., Jeyaraj, S., Perkins, D.J., Mordmuller, B., and Metzger, W.G. (2015). Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine* 2, 1186-1192.
- Lambrechts, L., Halbert, J., Durand, P., Gouagna, L.C., and Koella, J.C. (2005). Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 4, 3.
- Landau, I., and Boulard, Y. (2012). "Life Cycles and Morphology in Rodent Malaria " in *Rodent Malaria*, ed. R. Killick-Kendrick. Elsevier), 432.
- Larsen, M.R., Jensen, S.S., Jakobsen, L.A., and Heegaard, N.H. (2007). Exploring the sialome using titanium dioxide chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 6, 1778-1787.
- Lasonder, E., Green, J.L., Grainger, M., Langsley, G., and Holder, A.A. (2015). Extensive differential protein phosphorylation as intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* schizonts develop into extracellular invasive merozoites. *Proteomics* 15, 2716-2729.
- Lasonder, E., Ishihama, Y., Andersen, J.S., Vermunt, A.M., Pain, A., Sauerwein, R.W., Eling, W.M., Hall, N., Waters, A.P., Stunnenberg, H.G., and Mann, M. (2002). Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature* 419, 537-542.
- Lasonder, E., Treeck, M., Alam, M., and Tobin, A.B. (2012). Insights into the *Plasmodium falciparum* schizont phospho-proteome. *Microbes Infect* 14, 811-819.
- Laurentino, E.C., Taylor, S., Mair, G.R., Lasonder, E., Bartfai, R., Stunnenberg, H.G., Kroeze, H., Ramesar, J., Franke-Fayard, B., Khan, S.M., Janse, C.J., and Waters, A.P. (2011). Experimentally controlled downregulation of the histone chaperone FACT in *Plasmodium berghei* reveals that it is critical to male gamete fertility. *Cell Microbiol* 13, 1956-1974.
- Laveran, A. (1881a). *Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme. Description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre. Par A. Laveran.* Paris: J.-B. Baillière et fils.
- Laveran, C.L.A. (1881b). "Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme, description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre". (Paris: J.-B. Baillière).
- Laveran, C.L.A. (1898). *Traité du paludisme.* Libraires de L'Académie de Médecine.
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R.L., McIntosh, J.R., Miki, H., Mitchison, T.J., Okada, Y., Reddy, A.S., Saxton, W.M., Schliwa, M., Scholey, J.M., Vale, R.D., Walczak, C.E., and Wordeman, L. (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* 167, 19-22.
- Le Roch, K.G., Johnson, J.R., Ahiboh, H., Chung, D.W., Prudhomme, J., Plouffe, D., Henson, K., Zhou, Y., Witola, W., Yates, J.R., Mamoun, C.B., Winzeler, E.A., and Vial, H. (2008). A systematic approach to understand the mechanism of action of the bisthiazolium compound T4 on the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* 9, 513.
- Li, F., Patra, K.P., Yowell, C.A., Dame, J.B., Chin, K., and Vinetz, J.M. (2010). Apical Surface Expression of Aspartic Protease Plasmeprin 4, a Potential Transmission-blocking Target of the *Plasmodium* Ookinete. *Journal of Biological Chemistry* 285, 8076-8083.

- Lim, L., and Mcfadden, G.I. (2010). The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 749-763.
- Lind, J., and De La Chaume, T. (1777). *Essai sur les maladies des Européens dans les pays chauds et les moyens d'en prévenir les suites; suivi d'un appendice sur les fièvres intermittentes et d'un Mémoire qui fait connaître une méthode simple pour dessaler l'eau de mer et prévenir la disette des comestibles dans les navigations de long cours*. T. Barrois le jeune.
- Liu, N., Xiong, Y., Ren, Y., Zhang, L., He, X., Wang, X., Liu, M., Li, D., Shui, W., and Zhou, J. (2015). Proteomic Profiling and Functional Characterization of Multiple Post-Translational Modifications of Tubulin. *Journal of Proteome Research* 14, 3292-3304.
- Livnat, A. (2013). Interaction-based evolution: how natural selection and nonrandom mutation work together. *Biol Direct* 8, 24.
- Luah, Y.H., Chaal, B.K., Ong, E.Z., and Bozdech, Z. (2010). A moonlighting function of Plasmodium falciparum histone 3, mono-methylated at lysine 9? *PLoS One* 5, e10252.
- Lutz, A. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* [Online]. Biblioteca Virtual em Saúde: Fundação Oswaldo Cruz. Available: <http://www.bvsalutz.coc.fiocruz.br> [Accessed Dezembro 2015].
- Lutz, A. (1936). Reminiscencias da Febre Typhoide. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 31, 15.
- Macrae, J.I., Dixon, M.W., Dearnley, M.K., Chua, H.H., Chambers, J.M., Kenny, S., Bottova, I., Tilley, L., and Mcconville, M.J. (2013). Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *BMC Biol* 11, 67.
- Mair, G.R., Lasonder, E., Garver, L.S., Franke-Fayard, B.M., Carret, C.K., Wiegant, J.C., Dirks, R.W., Dimopoulos, G., Janse, C.J., and Waters, A.P. (2010). Universal features of post-transcriptional gene regulation are critical for Plasmodium zygote development. *PLoS Pathog* 6, e1000767.
- Mamoré, C.D.E.D.E.D.F.D.M.E. (1885). *Do Rio de Janeiro ao Amazonas e Alto Madeira : itinerario e trabalhos da Comissão de Estudos da Estrada de Ferro do Madeira e Mamoré : impressões de viagem por um dos membros da mesma comissão*. Rio de Janeiro: Soares & Niemeyer.
- Manson, P. (1878). On the Development of Filaria sanguinis hominis and on the Mosquito Considered as a Nurse. *Journal of Linnean Society of London* 14, 304-311.
- Marchetti, R.V., Lehane, A.M., Shafik, S.H., Winterberg, M., Martin, R.E., and Kirk, K. (2015). A lactate and formate transporter in the intraerythrocytic malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Nat Commun* 6, 6721.
- Marincola, F.M. (2007). In support of descriptive studies; relevance to translational research. *Journal of Translational Medicine* 5, 21.
- Marinha (1870). *Relatório do Ministério e Secretaria de Estado da Marinha do Brasil*. Arquivos da Marinha.
- Martin, S.K., Jett, M., and Schneider, I. (1994). Correlation of phosphoinositide hydrolysis with exflagellation in the malaria microgametocyte. *J Parasitol* 80, 371-378.
- Martini, E.M., Keeney, S., and Osley, M.A. (2002). A role for histone H2B during repair of UV-induced DNA damage in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* 160, 1375-1387.
- Massad, E., Behrens, R.H., Burattini, M.N., and Coutinho, F.A. (2009). Modeling the risk of malaria for travelers to areas with stable malaria transmission. *Malar J* 8, 296.
- Mcarthur, C.C., Meredith, J.M., and Eggleston, P. (2014). Transgenic Anopheles gambiae expressing an antimalarial peptide suffer no significant fitness cost. *PLoS One* 9, e88625.
- Mcfadden, G.I. (2014). Apicoplast. *Curr Biol* 24, R262-263.
- Mcrobert, L., Taylor, C.J., Deng, W., Fivelman, Q.L., Cummings, R.M., Polley, S.D., Billker, O., and Baker, D.A. (2008). Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. *PLoS Biol* 6, e139.
- Medica, D.L., and Sinnis, P. (2005). Quantitative dynamics of Plasmodium yoelii sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infect Immun* 73, 4363-4369.
- Mehta, M., Sonawat, H.M., and Sharma, S. (2005). Malaria parasite-infected erythrocytes inhibit glucose utilization in uninfected red cells. *FEBS Lett* 579, 6151-6158.
- Messin, L.J., and Millar, J.B. (2014). Role and regulation of kinesin-8 motors through the cell cycle. *Syst Synth Biol* 8, 205-213.

- Miao, J., Li, J., Fan, Q., Li, X., Li, X., and Cui, L. (2010). The Puf-family RNA-binding protein PfPuf2 regulates sexual development and sex differentiation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Cell Sci* 123, 1039-1049.
- Mitcheson, D.F., Tobin, A.B., and Alam, M.M. (2015). Applying chemical genetic tools to the study of phospho-signalling pathways in malaria parasites. *Biochim Biophys Acta* 1854, 1650-1656.
- Molina-Cruz, A., Lehmann, T., and Knockel, J. (2013). Could culicine mosquitoes transmit human malaria? *Trends Parasitol* 29, 530-537.
- Mons, B., Janse, C.J., Boorsma, E.G., and Van Der Kaay, H.J. (1985). Synchronized erythrocytic schizogony and gametocytogenesis of *Plasmodium berghei* in vivo and in vitro. *Parasitology* 91 (Pt 3), 423-430.
- Moreira, A.J. (1890). *Breve estudo sobre a etiologia da malaria*. Doctoral, Universidade do Porto.
- Moreno, J.E., Rubio-Palis, Y., Paez, E., Perez, E., Sanchez, V., and Vaccari, E. (2009). Malaria entomological inoculation rates in gold mining areas of Southern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 764-768.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., and Rodriguez, A. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* 291, 141-144.
- Ms (2014a). *Guia de Vigilância em Saúde* Brasília: Ministério da Saúde.
- Ms (2014b). *Mapa de risco da malária por município de infecção em 2014* [Online]. Available: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados> [Accessed Dez 2015].
- Muralidharan, V., Oksman, A., Pal, P., Lindquist, S., and Goldberg, D.E. (2012). *Plasmodium falciparum* heat shock protein 110 stabilizes the asparagine repeat-rich parasite proteome during malarial fevers. *Nat Commun* 3, 1310.
- Murray, C.J., Rosenfeld, L.C., Lim, S.S., Andrews, K.G., Foreman, K.J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., and Lopez, A.D. (2012). Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 379, 413-431.
- Natarajan, R., Thathy, V., Mota, M.M., Hafalla, J.C., Menard, R., and Vernick, K.D. (2001). Fluorescent *Plasmodium berghei* sporozoites and pre-erythrocytic stages: a new tool to study mosquito and mammalian host interactions with malaria parasites. *Cell Microbiol* 3, 371-379.
- North, W. (1896). *Roman fever : the results of an enquiry during three years' residence on the spot into the origin, history, distribution and nature of the malarial fever of the Roman Campagna, with especial reference to their supposed connection with pathogenic organisms*. London: Sampson Low, Marston & Company.
- Okamoto, N., Spurck, T.P., Goodman, C.D., and Mcfadden, G.I. (2009). Apicoplast and mitochondrion in gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* 8, 128-132.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635-648.
- Opas (2015). *Malaria Champions 2015* [Online]. Available: <http://www.paho.org/campeonesmalaria> [Accessed Dez 2015].
- Oppenheim, R.D., Creek, D.J., Macrae, J.I., Modrzynska, K.K., Pino, P., Limenitakis, J., Polonais, V., Seeber, F., Barrett, M.P., Billker, O., Mcconville, M.J., and Soldati-Favre, D. (2014). BCKDH: the missing link in apicomplexan mitochondrial metabolism is required for full virulence of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium berghei*. *PLoS Pathog* 10, e1004263.
- Orsburn, B.C., Stockwin, L.H., and Newton, D.L. (2011). Challenges in plasma membrane phosphoproteomics. *Expert Rev Proteomics* 8, 483-494.
- Pace, T., Olivieri, A., Sanchez, M., Albanesi, V., Picci, L., Siden Kiamos, I., Janse, C.J., Waters, A.P., Pizzi, E., and Ponzi, M. (2006). Set regulation in asexual and sexual *Plasmodium* parasites reveals a novel mechanism of stage-specific expression. *Mol Microbiol* 60, 870-882.
- Pallavi, R., Acharya, P., Chandran, S., Daily, J.P., and Tatu, U. (2010). Chaperone expression profiles correlate with distinct physiological states of *Plasmodium falciparum* in malaria patients. *Malaria Journal* 9, 1-12.

- Pandey, R., Mohammed, A., Pierrot, C., Khalife, J., Malhotra, P., and Gupta, D. (2014). Genome wide in silico analysis of Plasmodium falciparum phosphatome. *BMC Genomics* 15, 1024.
- Panichakul, T., Ponnikorn, S., Roytrakul, S., Paemanee, A., Kittisenachai, S., Hongeng, S., and Udomsangpetch, R. (2015). Plasmodium vivax inhibits erythroid cell growth through altered phosphorylation of the cytoskeletal protein ezrin. *Malar J* 14, 138.
- Patterson, S., Robert, C., Whittle, C., Chakrabarti, R., Doerig, C., and Chakrabarti, D. (2006). Pre-replication complex organization in the atypical DNA replication cycle of Plasmodium falciparum: characterization of the mini-chromosome maintenance (MCM) complex formation. *Mol Biochem Parasitol* 145, 50-59.
- Pearce, J.M. (2002). A brief history of the clinical thermometer. *QJM* 95, 251-252.
- Pease, B.N., Huttlin, E.L., Jedrychowski, M.P., Talevich, E., Harmon, J., Dillman, T., Kannan, N., Doerig, C., Chakrabarti, R., Gygi, S.P., and Chakrabarti, D. (2013). Global analysis of protein expression and phosphorylation of three stages of Plasmodium falciparum intraerythrocytic development. *J Proteome Res* 12, 4028-4045.
- Pinswasdi, C., Thaithong, S., Beale, G.H., Fenton, B., Webster, H.K., and Pavanand, K. (1987). Polymorphism of proteins in malaria parasites following mefloquine treatment. *Mol Biochem Parasitol* 23, 159-164.
- Pinto, J.C. (1904). *Estudo sobre a etiologia e a prophylaxia da Malaria*. Escola Medico-Cirurgica do Porto.
- Poncon, N., Toty, C., L'ambert, G., Le Goff, G., Brengues, C., Schaffner, F., and Fontenille, D. (2007). Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France. *Malar J* 6, 18.
- Ponzi, M., Siden-Kiamos, I., Bertuccini, L., Curra, C., Kroeze, H., Camarda, G., Pace, T., Franke-Fayard, B., Laurentino, E.C., Louis, C., Waters, A.P., Janse, C.J., and Alano, P. (2009). Egress of Plasmodium berghei gametes from their host erythrocyte is mediated by the MDV-1/PEG3 protein. *Cell Microbiol* 11, 1272-1288.
- Pradel, G. (2007). Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology* 134, 1911-1929.
- Pradel, G., and Frevort, U. (2001). Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* 33, 1154-1165.
- Prasad, C.S., Aparna, N., and Harendra Kumar, M.L. (2011). Exflagellated microgametes of Plasmodium vivax in human peripheral blood: an uncommon feature of malaria. *Indian J Hematol Blood Transfus* 27, 104-106.
- Queiroz, R.M., Charneau, S., Mandacaru, S.C., Schwammle, V., Lima, B.D., Roepstorff, P., and Ricart, C.A. (2014). Quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of Trypanosoma cruzi amastigogenesis. *Mol Cell Proteomics* 13, 3457-3472.
- Ralph, S.A., Van Dooren, G.G., Waller, R.F., Crawford, M.J., Fraunholz, M.J., Foth, B.J., Tonkin, C.J., Roos, D.S., and Mcfadden, G.I. (2004). Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the Plasmodium falciparum apicoplast. *Nat Rev Microbiol* 2, 203-216.
- Ramaiya, M.L., Kamath, V.R., and Renapurkar, D.M. (1987). Long-term in vitro cultivation of Plasmodium berghei. *Int J Parasitol* 17, 1329-1331.
- Ransom, M., Dennehey, B.K., and Tyler, J.K. (2010). Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell* 140, 183-195.
- Rappsilber, J., Mann, M., and Ishihama, Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* 2, 1896-1906.
- Rawlings, D.J., Fujioka, H., Fried, M., Keister, D.B., Aikawa, M., and Kaslow, D.C. (1992). Alpha-tubulin II is a male-specific protein in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 56, 239-250.
- Rayner, J.C. (2015). Plasmodium malariae Malaria: From Monkey to Man? *EBioMedicine* 2, 1023-1024.
- Read, M., Sherwin, T., Holloway, S.P., Gull, K., and Hyde, J.E. (1993). Microtubular organization visualized by immunofluorescence microscopy during erythrocytic schizogony in Plasmodium falciparum and investigation of post-translational modifications of parasite tubulin. *Parasitology* 106 (Pt 3), 223-232.

- Reddy, B.P., Shrestha, S., Hart, K.J., Liang, X., Kemirembe, K., Cui, L., and Lindner, S.E. (2015). A bioinformatic survey of RNA-binding proteins in Plasmodium. *BMC Genomics* 16, 890.
- Reish, O., Slatkin, M., Chapman-Shimshoni, D., Elizur, A., Chioza, B., Castleman, V., and Mitchison, H.M. (2010). Founder mutation(s) in the RSPH9 gene leading to primary ciliary dyskinesia in two inbred Bedouin families. *Ann Hum Genet* 74, 117-125.
- Rénia, L., Belnoue, E., and Landau, I. (2012). "Mouse Models for Pre-Erythrocytic-Stage Malaria," in *Malaria Methods and Protocols Vol. 72*, ed. D.L. Doolan. Humana Press).
- Rey, H. (1877). *L'Île de Sainte-Catherine*. Paris: J.-B. Baillière.
- Ricci, F. (2012). Social implications of malaria and their relationships with poverty. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 4, e2012048.
- Roche, L.-C., Blanchard, R., Pariset, É., Bousquet, J.B.É., Gérardin, A., Dubois, F., Mélier, F., Gibert, C.-M., Depaul, J.a.H., Devergie, A., Robin, C., Béclard, J., Roger, H., Bergeron, J., Proust, A., Féréol, F., Cadet De Gassicourt, E., Vallin, É., Jaccoud, S., Weiss, G., and Académie Nationale De Médecine (1880). "Bulletin de l'Académie nationale de médecine". (Paris: J.-B. Baillière Masson Académie nationale de médecine).
- Rodhain, F., and Charlot, G. (1982). Evaluation des risques de reprise de transmission du paludisme en France. *Médecine et Maladies Infectieuses* 12, 231-236.
- Roostalu, J., and Surrey, T. (2013). The multiple talents of kinesin-8. *Nat Cell Biol* 15, 889-891.
- Rosenqvist, H., Ye, J., and Jensen, O.N. (2011). Analytical strategies in mass spectrometry-based phosphoproteomics. *Methods Mol Biol* 753, 183-213.
- Sampaio, M.a.R.D. (1872a). *Prophylaxia da infecção palustre*. Imprensa Portugueza: Porto.
- Sampaio, M.a.R.D. (1872b). *Prophylaxia da Infecção Palustre*. Doctoral, Universidade do Porto.
- Sanni, L.A., Fonseca, L.F., and Langhorne, J. (2002). "Mouse Models for Erythrocytic-Stage Malaria," in *Malaria Methods and Protocols Vol. 72*, ed. D.L. Doolan. Humana Press).
- Saraf, A., Cervantes, S., Bunnik, E.M., Ponts, N., Sardu, M.E., Chung, D.D., Prudhomme, J., Varberg, J.M., Wen, Z., Washburn, M.P., Florens, L., and Le Roch, K.G. (2016). Dynamic and Combinatorial Landscape of Histone Modifications during the Intraerythrocytic Developmental Cycle of the Malaria Parasite. *J Proteome Res*.
- Saveliev, S., Bratz, M., Zubarev, R., Szapacs, M., Budamgunta, H., and Urh, M. (2013). Trypsin/Lys-C protease mix for enhanced protein mass spectrometry analysis. *Nat Meth* 10.
- Schneider, R., and Grosschedl, R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* 21, 3027-3043.
- Schwank, S., Sutherland, C.J., and Drakeley, C.J. (2010). Promiscuous expression of alpha-tubulin II in maturing male and female Plasmodium falciparum gametocytes. *PLoS One* 5, e14470.
- Seeber, F., Limenitakis, J., and Soldati-Favre, D. (2008). Apicomplexan mitochondrial metabolism: a story of gains, losses and retentions. *Trends Parasitol* 24, 468-478.
- Shin, Y., Du, Y., Collier, S.E., Ohi, M.D., Lang, M.J., and Ohi, R. (2015). Biased Brownian motion as a mechanism to facilitate nanometer-scale exploration of the microtubule plus end by a kinesin-8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E3826-3835.
- Shonhai, A. (2010). Plasmodial heat shock proteins: targets for chemotherapy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58, 61-74.
- Shortt, H.E., and Garnham, P.C. (1948). Pre-erythrocytic stage in mammalian malaria parasites. *Nature* 161, 126.
- Sickmann, A., and Meyer, H.E. (2001). Phosphoamino acid analysis. *Proteomics* 1, 200-206.
- Silva, J.P.B.D. (1896). *Necessidade do Diagnóstico Bacteriológico na Clínica*. Faculdade de Medicina e de Pharmacia do Rio de Janeiro.
- Sinden, R., Butcher, G., and Beetsma, A.L. (2002). "Maintenance of the Plasmodium berghei Life Cycle," in *Malaria Methods and Protocols*, ed. D. Doolan. Humana Press), 25-40.
- Sinden, R.E. (1982). Gametocytogenesis of Plasmodium falciparum in vitro: an electron microscopic study. *Parasitology* 84, 1-11.
- Sinden, R.E. (1999). Plasmodium differentiation in the mosquito. *Parassitologia* 41, 139-148.
- Sinden, R.E. (2012). "Infection of mosquitoes with rodent malaria," in *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual*, eds. J. Crampton, C. Beard & C. Louis. (Chapman and Hall).

- Sinden, R.E. (2015a). The cell biology of malaria infection of mosquito: advances and opportunities. *Cell Microbiol* 17, 451-466.
- Sinden, R.E. (2015b). The cell biology of malaria infection of mosquito: advances and opportunities. *Cellular Microbiology* 17, 451-466.
- Sinden, R.E., Canning, E.U., Bray, R.S., and Smalley, M.E. (1978). Gametocyte and gamete development in *Plasmodium falciparum*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 201, 375-399.
- Sinden, R.E., Carter, R., Drakeley, C., and Leroy, D. (2012). The biology of sexual development of *Plasmodium*: the design and implementation of transmission-blocking strategies. *Malar J* 11, 70.
- Sinden, R.E., Dawes, E.J., Alavi, Y., Waldock, J., Finney, O., Mendoza, J., Butcher, G.A., Andrews, L., Hill, A.V., Gilbert, S.C., and Basanez, M.G. (2007). Progression of *Plasmodium berghei* through *Anopheles stephensi* is density-dependent. *PLoS Pathog* 3, e195.
- Singhal, N., Atul, Mastan, B.S., Kumar, K.A., and Sijwali, P.S. (2014). Genetic ablation of plasmogonin, a multi-activity enzyme, attenuates parasite virulence and reduces oocyst production. *Biochem J* 461, 189-203.
- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Burkot, T.R., Harbach, R.E., and Hay, S.I. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors* 5, 69.
- Sinnis, P., De La Vega, P., Coppi, A., Krzych, U., and Mota, M.M. (2013). Quantification of sporozoite invasion, migration, and development by microscopy and flow cytometry. *Methods Mol Biol* 923, 385-400.
- Sinton, J.A., and Mulligan, H.W. (1932). *A Critical Review of the Literature Relating to the Identification of the Malarial Parasites Recorded from Monkeys of the Families Cercopithecidae and Colobidae*. Thacker's Press & Directories.
- Slavic, K., Delves, M.J., Prudencio, M., Talman, A.M., Straschil, U., Derbyshire, E.T., Xu, Z., Sinden, R.E., Mota, M.M., Morin, C., Tewari, R., Krishna, S., and Staines, H.M. (2011). Use of a Selective Inhibitor To Define the Chemotherapeutic Potential of the Plasmodial Hexose Transporter in Different Stages of the Parasite's Life Cycle. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 2824-2830.
- Sobetzko, P., Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2012). Gene order and chromosome dynamics coordinate spatiotemporal gene expression during the bacterial growth cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E42-50.
- Solyakov, L., Halbert, J., Alam, M.M., Semblat, J.P., Dorin-Semblat, D., Reininger, L., Bottrill, A.R., Mistry, S., Abdi, A., Fennell, C., Holland, Z., Demarta, C., Bouza, Y., Sicard, A., Nivez, M.P., Eschenlauer, S., Lama, T., Thomas, D.C., Sharma, P., Agarwal, S., Kern, S., Pradel, G., Graciotti, M., Tobin, A.B., and Doerig, C. (2011). Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* 2, 565.
- Souza, W.D. (2010). Doenças negligenciadas. *Academia Brasileira de Ciências*.
- Spector, D.L. (2003). The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem* 72, 573-608.
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M.M., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Gruning, N., Kruger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M.A., Breitenbach, M., Brindle, K.M., Rabinowitz, J.D., and Ralser, M. (2014). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc*.
- Stone, W.J., Eldering, M., Van Gemert, G.J., Lanke, K.H., Grignard, L., Van De Vegte-Bolmer, M.G., Siebelink-Stoter, R., Graumans, W., Roeffen, W.F., Drakeley, C.J., Sauerwein, R.W., and Bousema, T. (2013). The relevance and applicability of oocyst prevalence as a read-out for mosquito feeding assays. *Sci Rep* 3, 3418.
- Stumpff, J., Von Dassow, G., Wagenbach, M., Asbury, C., and Wordeman, L. (2008). The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control mitotic chromosome alignment. *Dev Cell* 14, 252-262.
- Stumpff, J., and Wordeman, L. (2007). Chromosome congression: the kinesin-8-step path to alignment. *Curr Biol* 17, R326-328.

- Sturm, A., Mollard, V., Cozijnsen, A., Goodman, C.D., and Mcfadden, G.I. (2015). Mitochondrial ATP synthase is dispensable in blood-stage *Plasmodium berghei* rodent malaria but essential in the mosquito phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 10216-10223.
- Sucen (2015). *Malária: Vetores* [Online]. SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias: Governo do Estado de São Paulo - Secretaria de Saúde. Available: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/malaria/vetores> [Accessed Dezembro 2015].
- Sucen (2016). Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo. Available: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias> [Accessed Jan 2016].
- Ta, T.H., Hisam, S., Lanza, M., Jiram, A.I., Ismail, N., and Rubio, J.M. (2014). First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malar J* 13, 68.
- Talevich, E., Tobin, A.B., Kannan, N., and Doerig, C. (2012). An evolutionary perspective on the kinome of malaria parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 2607-2618.
- Talman, A.M., Domarle, O., Mckenzie, F.E., Ariey, F., and Robert, V. (2004). Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 3, 24.
- Talman, A.M., Prieto, J.H., Marques, S., Ubaida-Mohien, C., Lawniczak, M., Wass, M.N., Xu, T., Frank, R., Ecker, A., Stanway, R.S., Krishna, S., Sternberg, M.J., Christophides, G.K., Graham, D.R., Dinglasan, R.R., Yates, J.R., 3rd, and Sinden, R.E. (2014). Proteomic analysis of the *Plasmodium* male gamete reveals the key role for glycolysis in flagellar motility. *Malar J* 13, 315.
- Tao, D., Ubaida-Mohien, C., Mathias, D.K., King, J.G., Pastrana-Mena, R., Tripathi, A., Goldowitz, I., Graham, D.R., Moss, E., Marti, M., and Dinglasan, R.R. (2014a). Sex-partitioning of the *Plasmodium falciparum* Stage V Gametocyte Proteome Provides Insight into falciparum-specific Cell Biology. *Molecular & Cellular Proteomics* 13, 2705-2724.
- Tao, D., Ubaida-Mohien, C., Mathias, D.K., King, J.G., Pastrana-Mena, R., Tripathi, A., Goldowitz, I., Graham, D.R., Moss, E., Marti, M., and Dinglasan, R.R. (2014b). Sex-partitioning of the *Plasmodium falciparum* stage V gametocyte proteome provides insight into falciparum-specific cell biology. *Mol Cell Proteomics* 13, 2705-2724.
- Tembhare, P., Shirke, S., Subramanian, P.G., Sehgal, K., and Gujral, S. (2009). Exflagellated microgametes of *Plasmodium vivax* in human peripheral blood: a case report and review of the literature. *Indian J Pathol Microbiol* 52, 252-254.
- Thingholm, T.E. (2008). "Test of 5 protocols for protein precipitation". (Odense: Univeristy of Southern Denmark).
- Thingholm, T.E., Jensen, O.N., and Larsen, M.R. (2009). Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* 9, 1451-1468.
- Thingholm, T.E., Jorgensen, T.J., Jensen, O.N., and Larsen, M.R. (2006). Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat Protoc* 1, 1929-1935.
- Thingholm, T.E., and Larsen, M.R. (2016). The Use of Titanium Dioxide for Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides. *Methods Mol Biol* 1355, 135-146.
- Tomei, E.J., and Wolniak, S.M. (2016). Transcriptome analysis reveals a diverse family of kinesins essential for spermatogenesis in the fern *Marsilea*. *Cytoskeleton (Hoboken)* 73, 145-159.
- Torres-Homem, J.V. (1877). *Estudo clínico sobre as febres do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- Trager, W., and Jensen, J.B. (2005). Human malaria parasites in continuous culture. 1976. *J Parasitol* 91, 484-486.
- Treeck, M., Sanders, J.L., Elias, J.E., and Boothroyd, J.C. (2011). The phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. *Cell Host Microbe* 10, 410-419.
- Tsai, M.Y., Morfini, G., Szebenyi, G., and Brady, S.T. (2000). Release of kinesin from vesicles by hsc70 and regulation of fast axonal transport. *Mol Biol Cell* 11, 2161-2173.
- Van Dijk, M.R., Janse, C.J., Thompson, J., Waters, A.P., Braks, J.A., Dodemont, H.J., Stunnenberg, H.G., Van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., and Eling, W. (2001). A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell* 104, 153-164.

- Van Dijk, M.R., Vinkenoog, R., Ramesar, J., Vervenne, R.A., Waters, A.P., and Janse, C.J. (1997). Replication, expression and segregation of plasmid-borne DNA in genetically transformed malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol* 86, 155-162.
- Van Dooren, G.G., Kennedy, A.T., and Mcfadden, G.I. (2012). The use and abuse of heme in apicomplexan parasites. *Antioxid Redox Signal* 17, 634-656.
- Vanderberg, J.P., and Gwadz, R. (2014). "The Transmission by Mosquitoes of Plasmodia in the Laboratory," in *Pathology, Vector Studies, and Culture*, ed. J.P. Kreier. Academic Press).
- Varga, V., Helenius, J., Tanaka, K., Hyman, A.A., Tanaka, T.U., and Howard, J. (2006). Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. *Nat Cell Biol* 8, 957-962.
- Vaughan, J.A., Noden, B.H., and Beier, J.C. (1994). Sporogonic development of cultured Plasmodium falciparum in six species of laboratory-reared Anopheles mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 51, 233-243.
- Vembar, S.S., Macpherson, C.R., Sismeiro, O., Coppee, J.Y., and Scherf, A. (2015). The PfAlba1 RNA-binding protein is an important regulator of translational timing in Plasmodium falciparum blood stages. *Genome Biol* 16, 212.
- Verhey, K.J., and Hammond, J.W. (2009). Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 765-777.
- Vincke, L.H., and Bafort, J. (1968). Résultats de deux ans d'observation sur la transmission cyclique de Plasmodium berghei *Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol* 48, 439-454.
- Wang, K., Zhao, Y., Li, M., Gao, F., Yang, M.K., Wang, X., Li, S., and Yang, P. (2014). Analysis of phosphoproteome in rice pistil. *Proteomics* 14, 2319-2334.
- Wass, M.N., Stanway, R., Blagborough, A.M., Lal, K., Prieto, J.H., Raine, D., Sternberg, M.J., Talman, A.M., Tomley, F., Yates, J., 3rd, and Sinden, R.E. (2012). Proteomic analysis of Plasmodium in the mosquito: progress and pitfalls. *Parasitology* 139, 1131-1145.
- Weber, H. (1865). "On Pettenkofer's Theory of the Mode of the Propagation of Cholera," in *Transactions of the Epidemiological Society of London*. (London: John W. Davies), 404-413.
- Weise, C., and Lenz, C. (2008). "Identification of Protein Phosphorylation Sites by Advanced LC-ESI-MS/MS Methods," in *Post-translational Modifications of Proteins: Tools for Functional Proteomics*, ed. C. Kannicht. (Totowa, NJ %@ 978-1-60327-084-7: Humana Press), 33-46.
- Wesseling, J.G., Snijders, P.J., Van Someren, P., Jansen, J., Smits, M.A., and Schoenmakers, J.G. (1989). Stage-specific expression and genomic organization of the actin genes of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 35, 167-176.
- White, D., Aghigh, S., Magder, I., Cosson, J., Huitorel, P., and Gagnon, C. (2005). Two anti-radial spoke monoclonal antibodies inhibit Chlamydomonas axonemal motility by different mechanisms. *J Biol Chem* 280, 14803-14810.
- Who (2010). *World Malaria Report 2010*.
- Who (2011). *World Malaria Report 2011*.
- Who (2014). *World Malaria Report 2014*.
- Who (2015a). *Global technical strategy for malaria 2016-2030*.
- Who (2015b). *International travel and health 2015*.
- Who (2015c). *World Malaria Report 2015*.
- Wickstead, B., and Gull, K. (2006). A "holistic" kinesin phylogeny reveals new kinesin families and predicts protein functions. *Mol Biol Cell* 17, 1734-1743.
- Wloga, D., and Gaertig, J. (2010). Post-translational modifications of microtubules. *Journal of Cell Science* 123, 3447-3455.
- Wu, B., Rambow, J., Bock, S., Holm-Bertelsen, J., Wiechert, M., Soares, A.B., Spielmann, T., and Beitz, E. (2015). Identity of a Plasmodium lactate/H(+) symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat Commun* 6, 6284.
- Wu, Y., Nelson, M.M., Quaile, A., Xia, D., Wastling, J.M., and Craig, A. (2009). Identification of phosphorylated proteins in erythrocytes infected by the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Malar J* 8, 105.
- Yokoyama, R., O'toole, E., Ghosh, S., and Mitchell, D.R. (2004). Regulation of flagellar dynein activity by a central pair kinesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17398-17403.

- Young, J.A., Fivelman, Q.L., Blair, P.L., De La Vega, P., Le Roch, K.G., Zhou, Y., Carucci, D.J., Baker, D.A., and Winzeler, E.A. (2005). The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: A microarray analysis using ontology-based pattern identification. *Molecular and Biochemical Parasitology* 143, 67-79.
- Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Levenson, J.D., Bossy-Wetzel, E., Fan, J.B., Abraham, R.T., and Jiang, W. (2005). Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol Biol Cell* 16, 3187-3199.
- Zikova, A., Hampl, V., Paris, Z., Tyc, J., and Lukes, J. (2016). Aerobic mitochondria of parasitic protists: Diverse genomes and complex functions. *Mol Biochem Parasitol.*
- Zininga, T., Achilonu, I., Hoppe, H., Prinsloo, E., Dirr, H.W., and Shonhai, A. (2016). *Plasmodium falciparum* Hsp70-z, an Hsp110 homologue, exhibits independent chaperone activity and interacts with Hsp70-1 in a nucleotide-dependent fashion. *Cell Stress Chaperones* 21, 499-513.

8. Índice de figuras

Figura 1 : Número de publicações sobre malária indexados no PubMed de 1845 a 2016. Dados de 1845 a 1945 foram somados e representados em uma única barra no gráfico.	12
Figura 2 : <i>Anopheles (Kerteszia) cruzii</i> , 1903. Primeiro vetor descrito por Aldopho Lutz como provável causador da malária no Brasil na região do interior do Estado de São Paulo (Lutz).16	
Figura 3 : Distribuição geográfica da malária no Mundo. A malária é transmitida em áreas tropicais e subtropicais. O mapa tem representado o número de mortes evitadas no período entre 2001 a 2013. Modificada de Relatório sobre Malária de 2014 (WHO, 2014).....	18
Figura 4 : Mapa das Américas Centrais e do Sul com status percentual de risco populacional e fases de programa estratégico: fases de controle, pré-eliminação, eliminação e prevenção de reintrodução da malária.....	20
Figura 5 : Mapa de risco da malária no Brasil de acordo com o Ministério da Saúde para 2014 (MS, 2014b) (A) e áreas de maior incidência de casos de malária no Brasil em 2015 (B), pelo relatório da OMS de 2015. Distribuição de casos confirmados da malária (por 1000 habitantes).	21
Figura 6 : Selo intitulado <i>La lutte contre le paludisme</i> de autoria de René Cottet. Foi emitida em 1962 pela La Poste, inicialmente em Paris, em comemoração a luta pela erradicação da malária (Cottet, 1962).	22
Figura 7 : Diagrama gráfico com principais estratégia para desenvolvimento de fármacos antimaláricos com uso de experimentação animal em estudos de campo (Flannery et al., 2013).	25
Figura 8 : Representação do racional das estratégias para prevenção e tratamento da malária (WHO, 2015c).....	28
Figura 9 : Algoritmo utilizado por equipes de saúde médica para investigação de suspeito de malária (MS, 2014a).	28
Figura 10 : Algoritmo recomendado pelo Guia de Vigilância em Saúde 2014 (MS, 2014a) para decisão após diagnóstico em malária de pacientes.	29
Figura 11 : Representação esquemática do transcurso da forma esporozoíto do parasita após transmissão pelo mosquito (Graewe et al., 2012).	32
Figura 12 : Relação da probabilidade de contrair malária pela duração da exposição ao longo das diversas condições microclimáticas e variáveis populacionais dos mosquitos em cada estação do ano (Massad et al., 2009).	34
Figura 13 : Mapa das prováveis rotas transatlânticas da África para as América (Sinka et al., 2012).	36
Figura 14 : Distribuição global dos casos de resistência a piretroide reportados até 2014 (WHO, 2015c).....	37
Figura 15 : Representação geral com os três ciclos de vida do gênero <i>Plasmodium</i> e a representação de dois de seus hospedeiros (Bousema and Drakeley, 2011).	38
Figura 16 : A) Ciclo assexuado eritrocitário. B) Representação gráfica das etapas infecciosas do gênero <i>Plasmodium</i> no ser humano em sequencia da picadura do mosquito. 1) infecção; 2) fase pré-eritrocitário; 3) formação de merozoítos no ciclo eritrocitário; e 4) gametocitogênese a partir do ciclo eritrocitário. Imagem modificada de (Guttery et al., 2012b).	41
Figura 17 : Cinco etapas de desenvolvimento de gametócitos de <i>P. falciparum</i> até a competência para fertilização (Josling and Llinas, 2015).	43
Figura 18 : Ciclo parasitário sexuado representando a formação do zigoto, invasão do oocineto, desenvolvimento do oocisto e invasão das glândulas salivares (Guttery et al., 2014).	44

Figura 19 : Representação esquemática das estruturas celulares do macrogametócito e do microgametócito de <i>Plasmodium</i> infectante de aves com diferença do tamanho do núcleo e quantidade de ribossomos dentro de eritrócitos de aviários, de acordo com Carter, R. <i>et al</i> (Carter and Graves, 1989).	47
Figura 20 : Representação das etapas de ativação de gametócitos masculino e feminino de <i>P. falciparum</i> , seguido da formação de gametas (modificado de Trustees of the Wellcome Trust).	49
Figura 21 : Visão global das vias de sinalização relacionadas a ativação da gametogênese em <i>Plasmodium</i> onde cálcio de retículo endoplasmático (ER) seria liberado após a atuação de mensageiros secundários diacilglicerol e inositol trifosfato (IP3) e desencadeariam cascatas de sinalização celular para ativação de vias metabólicas importantes para a gametogênese (Kuehn and Pradel, 2010).	50
Figura 22 : Representação esquemática das cinesinas de algumas famílias onde pode-se observar domínio motor conservado e diversidade de domínio variável entre famílias de cinesina (Verhey and Hammond, 2009).	57
Figura 23 : Representação esquemática da estrutura da cinesina 8 com seus domínios motores e variável e sua forma dimérica. Modificado de (Roostalu and Surrey, 2013).	58
Figura 24 : Imagem modificada de Messin <i>et. al.</i> (Messin and Millar, 2014). A seta representa o sentido de deslocamento da cinesina 8 sobre as unidades alfa e beta de tubulina, que formam o microtúbulo, e se concentram na exterminada positiva (<i>plus end</i>). Representados em 1) unidade de tubulina alfa (em azul); 2) unidade de tubulina (em vermelho) beta; 3) unidades de cinesina 8 (em verde).	60
Figura 25 : Fenótipo do parasitas mutantes comparado com o selvagem por microscopia eletrônica de gametócitos macho ao 15 min da indução das diferenciação celular. Todas figuras correspondem ao parasita ao 15 ^o min apos a ativação, exceto a figura H onde temos 30 min transcorrido após ativação. Para o mutante, não houve a formação de microgametas nem eventos de exflagelação. Pode ser observada desorganização do axonema, possivelmente decorrente da montagem dos microtúbulos e incapacidade de exflagelação em <i>P. berghei</i> mutante para cinesina 8. C) organismo selvagem em corte transversal com ampliação de axonemas a direita, estrutura do axonemas em 9 + 2. D) Organismo mutante em corte transversal com detalhe a direita, estrutura do axonemas desarranjada. Dados gentilmente fornecidos pelo grupo do professor P. Grellier/ Delphine Depoix. Captura de imagem pelo Dr. David Ferguson. (BB: Basal body; A: Axoneme; Cond. chr.: condensed chromatin; MTOC: microtubule-organizing center). Escala de barras de 200 nm ou 500 nm.....	63
Figura 26 : Desenho experimental da análise intra-classe dos experimentos dos selvagens como também para experimento com os mutantes.	84

9. Índice de tabelas

Tabela 1: Relação de mosquitos com capacidade vetorial e mosquitos sem capacidade para transmissão de <i>P. berghei</i> (Sinden et al., 2002).....	53
--	----

10. Resumos

Investigation of the molecular events in *Plasmodium berghei* gametogenesis through proteomic approaches

Abstract:

Malaria is one of the most serious and widespread parasitic diseases that affected humans in medicine history. The disease is caused by parasites from *Plasmodium* genus. Rodent malaria parasites are commonly used as model since it permits the combination of *in vivo* and *in vitro* experiments and reverse genetic studies. Although *Plasmodium* sexual stages gametogenesis is an essential step to ensure the malaria transmission, molecular data on nuclear reorganization and intracytoplasmic flagellum assembly proteins and their regulating in gametogenesis is still missing.

The *P. berghei* motor ATPase kinesin 8 is proposed as important component for male gametogenesis. Kin8-disrupted gametocytes (Δ kin8) were morphologically similar to wild-type (WT) parasites, while male gametogenesis is not functional and able to exflagellate.

In efforts to improve the knowledge on gamete exflagellation, we did quantitative proteomic and phosphoproteomic experiments with WT and Δ kin8 gametocytes. Gametocytes-enriched sample from mice blood at time T0 were xanthurenic acid-induced to exflagellate and harvested at time T7 and T15 min. The relative quantitative comparisons overtime were performed through iTRAQ labelled peptides from independent biological triplicate sample analysed by nanoLC/MS-MS Orbitrap Elite Mass Spectrometer after TiO₂ enrichment. Data was processed through Patternlab for Proteomics software and Blast2GO.

In the WT parasites, 443 proteins and 206 phosphoproteins were identified from 2,617 peptides. In Δ kin8 parasites, 530 proteins and 218 phosphoproteins were identified from 3,198 peptides. Gamete formation is highly regulated by phosphorylation in both cell conditions. Among GO biological processes, those related to RNA translation, DNA and protein biosynthesis were most prominent and strongly regulated throughout the gametogenesis, and phosphorylated proteins are mainly RNA, ATP or protein binding proteins. We observed that glycolysis and environmental stress response are predominant, mainly at the beginning of the differentiation.

For Δ kin8 parasites, axoneme and mitotic spindle microtubules disorganization is likely to be caused by motor proteins down-regulation (kinesin-8, -13, and dynein) as well as by up-regulated proteins from inner arm and radial spoke organization. We noticed important down-expression of nucleosome units, up-expression of proteins involved in the replication that could be related to the nuclear division disorganisation. A higher expression of proteins involved in the ubiquitin-dependant proteasome complex and stress response and folding, and lower expression of some proteins that interferes in energy metabolism and egress in the mutant compared to the WT. The Δ kin8 proteomic approach brings new clues on the exflagellation and the mutant microgamete impairment observed.

In conclusion, gametogenesis clearly requires a high protein expression and phosphorylation modulation to produce energy for gamete differentiation. Kinesin 8 is essential for male gametogenesis and normal axoneme assembly in *P. berghei*, providing new insights into *Plasmodium* flagellar organization and biology.

Keywords: *Plasmodium*, gametogenesis, exflagellation, quantitative proteomics, phosphopeptide, proteome, phosphoproteome, kinesin, mutant.

Estudo dos eventos moleculares da gametogênese de *Plasmodium berghei* por abordagens proteômicas

Resumo:

Na história da medicina, a malária é uma das doenças parasitárias mais graves e distribuídas que afetam seres humanos. A doença é causada por parasitas do gênero *Plasmodium*. A malária de roedores é utilizada comumente como modelo por permitir a combinação de experimentos *in vivo* e *in vitro*, além de estudos por genética reversa. Embora a gametogênese dos estágios sexuais de *Plasmodium* seja um passo essencial da transmissão da malária, dados moleculares sobre a reorganização nuclear, montagem do flagelo e sua regulação na gametogênese estão incompletas.

A ATPase cinesina-8 de *P. berghei* é uma proteína motora sugerida como um importante componente para a gametogênese macho. Os gametócitos com o gene *kin8* interrompido ($\Delta kin8$) são semelhantes morfológicamente aos tipos selvagens (WT), enquanto que na gametogênese existe disfunção que tornam as células $\Delta kin8$ incompetentes para gametogênese completa e incapazes de exflagelar.

Nos esforços para melhorar o conhecimento sobre a exflagelação de gametas, fizemos experimentos quantitativos de proteômica e fosfoproteômica com gametócitos WT e $\Delta kin8$. A amostra enriquecida de gametócitos do sangue murinho no tempo T0 foi induzida a exflagelação por ácido xanturênico e colhida no tempo T7 e T15 min. A quantificação relativa entre amostras foi realizada com uso de peptídeos marcados por iTRAQ na triplicata biológica independente e analisados por nanoLC/MS-MS Orbitrap Elite Mass Spectrometer após enriquecimento TiO_2 . Os dados foram processados através do softwares Patternlab for Proteomics e Blast2GO.

Em parasitas WT, 443 proteínas e 206 fosfoproteínas foram identificados a partir de 2.617 peptídeos. Em parasitas $\Delta kin8$, 530 proteínas e 218 fosfoproteínas proteínas foram identificadas a partir de 3.198 peptídeos. A produção de gametas é regulada por fosforilações nas duas condições celulares. Entre os processos biológicos da Ontologia de Genes, aqueles relacionados a tradução de RNA, e biossíntese de DNA e proteínas foram as que mais se destacaram e mais regulados na gametogênese. Foi observado também que a glicólise e a resposta ao estresse ambiental foram mais notável principalmente no início da diferenciação celular.

Para $\Delta kin8$, a desorganização de microtúbulos dos axonemas e fusos mitóticos é causa provável da supressão de proteínas motoras (cinesina -8, -13 e dineína) como também pela superexpressão de proteínas de organização do braço interno e braço radial. Observamos importante diminuição de unidades de nucleossomos e aumento de proteínas envolvidas com a desorganização da divisão nuclear. Quando comparado com o WT, no mutante houve maior expressão de proteínas envolvidas no complexo proteassoma dependente de ubiquitina e menor quantidade de algumas proteínas interferentes no metabolismo energético e egresso. A análise do $\Delta kin8$ traz novas informações sobre a exflagelação e mal funcionamento do microgameta mutante.

Em conclusão, a gametogênese exige manifestamente a expressão de proteínas e sua regulação por fosforilações para a produção de energia na diferenciação dos gametas. A Cinesina 8 é essencial para a gametogênese masculina normal como também para a montagem de axonemas em *P. berghei*, e seu estudo fornece informações quanto a organização celular e biologia de *Plasmodium*.

Palavras-chave: *Plasmodium*, gametogênese, exflagelação, proteômica quantitativa, fosfopeptídeo, proteoma, fosfoproteoma, cinesina, mutante.

Etude les événements moléculaires de la gamétogenèse de *Plasmodium berghei* par des approches protéomiques

Résumé:

Dans l'histoire de la médecine, le paludisme est l'une des maladies parasitaires les plus graves et répandues. Elle est causée par des parasites du genre *Plasmodium*. Les parasites du paludisme de rongeurs sont couramment utilisés comme modèles pour étudier le paludisme humain permettant des études de génétique inverse *in vivo*. Bien que la gamétogenèse des stades sexués de *Plasmodium* soit une étape essentielle pour la transmission du paludisme, les données moléculaires sur la réorganisation nucléaire, l'assemblage du flagelle et de leurs régulations pendant la gamétogenèse, sont toujours incomplètes.

La kinésine-8 de *P. berghei* est une protéine motrice qui jouerait un rôle important lors de la formation des gamètes mâles. Les gamétocytes avec le gène *kin8* interrompu ($\Delta kin8$) sont morphologiquement semblables au type sauvage (WT) mais la gamétogenèse mâle n'est pas fonctionnelle et les cellules mutantes sont incapables de produire des gamètes mâles.

Afin d'avoir une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires mis en œuvre au cours de la gamétogenèse, nous avons entrepris des études protéomiques et phosphoprotéomiques comparatives et quantitatives chez le parasite de type sauvage et chez le mutant $\Delta kin8$. Les gamétocytes enrichis à partir du sang de souris infectées ont été récoltés au temps 0, 7 et 15 min après induction de la gamétogenèse par l'acide xanthurénique. Des comparaisons quantitatives relatives ont été effectuées par nanoLC/MS-MS du type Orbitrap Elite à partir des peptides et phosphopeptides préalablement enrichis par TiO_2 , marqués par iTRAQ, et de triplicats biologiques. Les données ont été traitées par les logiciels *Patternlab for Proteomics* et *Blast2GO*.

Chez WT, 443 protéines et 206 phosphoprotéines ont été identifiées à partir de 2.617 peptides. Chez $\Delta kin8$, 530 protéines et 218 phosphoprotéines ont été identifiées à partir de 3.198 peptides. La formation de gamètes est fortement régulée par phosphorylation dans les deux conditions cellulaires. Parmi les processus biologiques (*GO term*), ceux liés à la traduction de l'ARN, la biosynthèse de l'ADN et de protéines sont les plus marquants et les plus régulés. La glycolyse et la réponse aux stress environnementaux sont également prédominantes, surtout au début de la différenciation des gamètes.

Chez $\Delta kin8$, une forte sous-expression des protéines motrices kinésine-13 et dynéine, et une surexpression de protéines de l'organisation des bras intérieur et radiaire des axonèmes sont observées. La modulation de l'expression de ces protéines participe certainement, en plus de l'absence de la kinésine-8, au phénotype observé chez $\Delta kin8$: l'absence d'assemblage des axonèmes des gamètes mâles. Nous avons constaté également une sous-expression significative d'unités des nucléosomes et la surexpression de protéines impliquées dans la réplication. Ceci pourrait être relié à la perturbation de la division nucléaire observée chez $\Delta kin8$. Par rapport au WT, $\Delta kin8$ montre une expression élevée de protéines du complexe de protéasome dépendant de l'ubiquitine et de protéines impliquées dans la réponse au stress et le repliement des protéines, ainsi qu'une faible expression de certaines protéines qui interviennent dans le métabolisme énergétique et la sortie de l'hématie.

Ces approches de protéomique et phosphoprotéomique comparatives permettent pour la première fois d'identifier les événements moléculaires, leur dynamique et leur modulation, mis en jeu lors de la gamétogenèse de *P. berghei*.

Mots-clés: *Plasmodium*, gamétogenèse, exflagellation, protéomique quantitative, phosphopeptide, protéome, phosphoprotéome, kinésine, mutant.