CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DEL CUELLO DE LAS ROPTRIAS 5 EN *Plasmodium falciparum* (PfRON5).

LILIANA CATHERINE PATIÑO MOLANO

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO FACULTAD DE MEDICINA UNIDAD DE GENÉTICA

Bogotá, Junio 28 de 2011

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DEL CUELLO DE LAS ROPTRIAS 5 EN Plasmodium falciparum (PfRON5).

LILIANA CATHERINE PATIÑO MOLANO

Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar al título de MAESTRÍA en CIENCIAS con énfasis en GENÉTICA HUMANA

Director: HERNANDO CURTIDOR CASTELLANOS, cPHD.

Bogotá, 2011

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

"La Universidad del Rosario no se hace responsable por los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia".

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien me ha colmado de bendiciones y poco a poco me ha mostrado el camino a seguir.

A mis padres, porque a ellos les debo todo, porque con el amor que me han dado, los sacrificios que han hecho, junto con sus enseñanzas y consejos hacen que mi hermano y yo seamos cada día mejores personas. Gracias por su impulso constante para que logremos nuestros sueños. Espero seguir siendo siempre para ellos un motivo de orgullo.

A Santi, por su amor incondicional y porque siempre ha sido un gran apoyo en todo momento.

Al jefe, el Dr. Manuel Elkin Patarroyo, porque con su ejemplo he aprendido que nunca hay que darse por vencido, con inteligencia, y perseverancia se logran grandes cosas.

Al Doctor Manuel Alfonso Patarroyo, porque desde que me aceptó en el Instituto para realizar la pasantía de pre-grado y posteriormente permitió mi contratación, depositó su confianza en mí, y esto significó el comienzo de mi formación científica en la Fundación Instituto de Inmunología, a la que debo gran parte de conocimiento.

A mi director Hernando Curtidor, porque sin su apoyo hubiese sido muy difícil que este trabajo se llevara a cabo, porque me abrió las puertas de su laboratorio y me permitió ser parte de su equipo de trabajo. Gracias por toda la paciencia, confianza, por su apoyo, sus enseñanzas y por su amistad.

A mis compañeritas y amigas del grupo funcional Receptores: Gaby y Dianita, porque se estableció un vínculo muy bonito de amistad y compañerismo muy importante en el ambiente laboral. Y también a Martuchín, porque me brindo su gran amistad y apoyo.

A todas las personas de la FIDIC que han contribuido con mi formación científica, con quienes he trabajado y de quienes de una u otra manera he aprendido muchas cosas, algunos ya no están pero de cada uno de ellos he aprendido algo: A Mile, Sara, Caro López, Andrómeda, Catherin Marín, Diego, Martha Fo, Yolis y Gaby.

A la Unidad de Genética de la Universidad del Rosario por permitirme ser parte de una gran escuela, y a sus docentes: Nora, Heidy, Carlos Prada y el Dr. Restrepo por sus enseñanzas y en especial a los profes Dora y Paul, de quienes aprendí muchísimo.

A mis compañeritos de la maestría, Taryn, Nidia, Diego, Daniel y Mile, con quienes compartimos muchas alegrías, algunas tristezas y mucho estrés.

Por último, mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que me brindaron su colaboración y conocimientos, durante la realización de este proyecto, ya que este el resultado de un gran equipo de trabajo, a cada uno de ellos, Gracias.

DEDICATORIA

A mis padres

Hernando Curtidor Castellanos, cPhD. Director de tesis

Dora Janeth Fonseca Mendoza, MSc Jurado

Ruth Elizabeth Garzón Fernández, PhD. Jurado Nora Constanza de Jesús Contreras Bravo. MSc Coordinadora Maestría en Ciencias con énfasis en Genética

Carlos Martín Restrepo Fernández. MD. MSc. PhD Director Maestría en Ciencias con énfasis en Genética

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	3
3. OBJETIVOS	4
3.1. Objetivo General	4
3.2. Objetivos Específicos	4
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1. Malaria en el mundo	5
4.2. Malaria en Colombia	5
4.3. Estrategias de control	7
4.4. Agente etiológico	8
4.5. El merozoito	10
4.6. Invasión del merozoito al glóbulo rojo	11
4.7. Tight junction en <i>Toxoplasma</i>	13
4.8. Tight Junction en <i>Plasmodium</i>	15
5. HIPÓTESIS	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Tipo de estudio	21
6.2. Metodología	21
6.2.1. Estudio del ADN genómico	21
6.2.1.1. Extracción del ADN del parásito	21
6.2.1.2. Amplificación del ADN genómico	21
6.2.2. Estudio de la transcripción del gen que codifica para PfRON5	23
6.2.2.1. Extracción de ARN	23
6.2.2.2. Síntesis de ADN copia (ADNc)	23
6.2.2.3. Amplificación ADNc de PfRON5	24
6.2.2.4. Purificación del producto de PCR obtenido de la amplificación del ADNc	25
6.2.2.5. Adenilación.	25
6.2.2.6. Ligación	25
6.2.2.7. Transformación	26
6.2.2.8. Extracción y purificación del ADN plasmídico	28
6.2.2.9. Secuenciación	28
6.2.3. Estudio bioinformático	29
6.2.4. Obtención de anticuerpos anti-PfRON5	29

6.2.4.1. Selección y síntesis de los péptidos a inocular	29
6.2.4.2. Esquema de inmunización	30
6.2.4.3. Adsorción de los sueros de conejo	30
6.2.4.4. Inmunogenicidad de los péptidos inoculados.	31
6.2.5. Análisis de la expresión de la proteína PfRON5	31
6.2.5.1. SDS-PAGE y Western blot	31
6.2.5.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	32
6.2.5.3. Microscopía Inmunoelectrónica.	33
7. ASPECTOS ÉTICOS	34
8. RESULTADOS	35
8.1. Obtención del ADN parasitario y amplificación del gen <i>PfRON5</i>	35
8.2. Estudio de la transcripción.	35
8.2.1. Amplificación del ADNc de PfRON5	35
8.2.2. Clonación	36
8.2.3. Análisis de la secuencia PfRON5.	37
8.3. Estudio bioinformático.	38
8.4. Obtención de anticuerpos anti-PfRON5	43
8.4.1. Péptidos a inocular	43
8.4.2. Reconocimiento de los péptidos inoculados.	44
8.5. Análisis de la expresión de la proteína PfRON5.	44
8.5.1. Detección de la proteína PfRON5 en los lisados de P. falciparum.	44
8.5.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	45
8.5.3. Microscopía Inmunoelectrónica	46
9. DISCUSIÓN	47
10. CONCLUSIONES	53
11. PERSPECTIVAS	54
12. BIBLIOGRAFIA	55
13. ANEXOS	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia anual de malaria.	5
Figura 2. Casos de malaria por municipio y especie parasitaria en Colombia.	6
Figura 3. Número de casos de malaria y porcentaje de casos según departamento de	
procedencia en Colombia.	7
Figura 4. Estado global de la resistencia a cloroquina y sulfadoxina/pirimetamina.	8
Figura 5. Ciclo de vida de Plasmodium falciparum	10
Figura 6. Representación esquemática del merozoito.	11
Figura 7. Invasión del merozoito al glóbulo rojo.	12
Figura 8. Comparación de la morfología celular del merozoito de P. falciparum y el taquizoito	
de T. gondii.	13
Figura 9. Localización del Tight Junction durante la invasión.	14
Figura 10. Representación esquemática de la organización del MJ.	15
Figura 11. Microscopía electrónica de la invasión del merozoito de Plasmodium a los eritrocitos	16
Figura 12. Inmunoprecipitación con anti-PfAMA1 y anti-PfRON4.	17
Figura 13. El anticuerpo 4G2 no co-precipita con las proteínas RONs.	17
Figura 14. Modo de acción propuesto para la inhibición de la invasión por parte del anticuerpo	
4G2.	18
Figura 15. Inhibición de la invasión por parte del péptido R1.	18
Figura 16. Primers de amplificación ADN genómico.	22
Figura 17. Acción de la topoisomerasa I en el kit pEXP5- CT/TOPO® TA (Invitrogen).	26
Figura 18. Carta del vector pEXP5- CT/TOPO® TA (Invitrogen).	27
Figura 19. Representación gráfica de los primers utilizados para secuenciación del	
ADNc de PfRON5.	28
Figura 20. Extracción del ADN genómico y amplificación de un fragmento del gen PfRON5.	35
Figura 21. El gen que codifica para PfRON5 se transcribe.	36
Figura 22. Confirmación de las bacterias recombinantes.	36
Figura 23. Extracción ADN plasmídico de colonias recombinantes.	37
Figura 24. Representación esquemática del ADN genómico.	38
Figura 25. Alineamiento de las secuencias de las proteínas RON5 en diferentes	
especies de Plasmodium.	40
Figura 26. Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de PfRON5 y ortólogos.	42
Figura 27. Representación esquemática de la proteína PfRON5 y los péptidos inoculados.	43
Figura 28. Reconocimiento de los sueros hacia los péptidos inoculados.	44

Figura 29. Tiempo de expresión de la proteína PfRON5. Western	45
Figura 30. Localización de la proteína PfRON5 por IFI.	45
Figura 31. La proteína PfRON5 se localiza en el cuello de las roptrias.	46
Figura 32. Árbol filogenético del género Plasmodium.	49
Figura 33. Predicción de la estructura secundaria de la proteína PfRON5.	50
Figura 34. Topología hipotética para la proteína PfRON5.	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cambios en la secuencia del ADNc y de la proteína de PfRON5 de las cepas FCB-2	38
y Pas-2, respecto a la cepa de referencia (3D7).	
Tabla 2. Organización de los exones en el gen PfRON5.	39
Tabla 3. Regiones transmembranales predichas utilizando diferentes predictores.	43
Tabla 4. Nivel de expresión (E) de PfRON5 en diferentes estadíos del ciclo eritrocítico.	51

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Alineamientos en nucleótidos y aminoácidos de PfRON5 de las cepas secuenciadas.	60
ANEXO 2. Alineamiento de secuencias homólogas en diferentes géneros y especies	
del filo Apicomplexa.	64
ANEXO 3. Alineamiento de secuencias homólogas en diferentes géneros y especies	
del filo Apicomplexa.	70
ANEXO 4. Árboles filogenéticos de aminoácidos de la proteína PfRON5 y proteínas	
homólogas encontradas.	74
ANEXO 5. Árboles filogenéticos reconstruidos con el marcador filogenético 18S rRNA	76
ANEXO 6. Alineamiento de los dominios transmembranales (TMs) conservados,	
predichos por Polyphobius en diferentes géneros del filo Apicomplexa y especies de Plasmodium	77
ANEXO 7. Formato de salida de la predicción de la estructura secundaria por SOPMA.	78

1. INTRODUCCIÓN

La malaria es una de las enfermedades parasitarias mas ampliamente distribuidas en el mundo, se estima que anualmente se presentan 250 millones de casos clínicos y 900 mil muertes, siendo las principales victimas niños menores de 5 años y adultos en edad productiva. Esta enfermedad es causada en el humano por cinco especies de *Plasmodium: P. ovale, P. malariae, P. knowlesi, P. vivax* y *P. falciparum*, siendo la última la que presenta mayor morbilidad, mortalidad y mas amplia distribución a nivel mundial (WHO, 2009; Garcia, 2010).

Se han diseñado varias estrategias para controlar esta enfermedad, como el uso de pesticidas y mosquiteros, drogas antimaláricas y diferentes tipos de vacunas (Good, 2001; Ridley, 2003). Sin embargo, factores tales como la expansión global de la enfermedad, el incremento de cepas resistentes a drogas antimaláricas, la diversidad genética del parásito, la resistencia del vector a insecticidas y las condiciones socioeconómicas de las poblaciones afectadas, justifican la búsqueda y adopción de nuevas medidas de control (Good, 2001). Es por esto que se ha sugerido que el desarrollo de una vacuna que incluya diferentes antígenos (multiantígeno) derivados de distintas formas invasivas (multiestadio), podría ser una estrategia adecuada para controlar definitivamente esta enfermedad (Patarroyo and Patarroyo, 2008; Patarroyo et al., 2011).

El merozoito es el estadío parasitario involucrado en el proceso de invasión al glóbulo rojo y ha sido considerado uno de los blancos de estudio más importantes para el desarrollo de una vacuna. Esto se soporta con tres factores importantes: primero, el ciclo eritrocítico es el responsable de la mayoría de síntomas clínicos; segundo, es posible mantener los estadios de este ciclo en un cultivo *in vitro*; y tercero, las proteínas derivadas de la superficie y de algunos organelos, principalmente de roptrias y micronemas, se exponen al sistema inmune en el proceso de invasión (Cowman et al., 2002).

En el proceso de invasión al glóbulo rojo ocurre una interacción fuerte entre las membranas del merozoito y la célula huésped, conocida como Tight Junction (TJ), la cual migra desde la porción apical del parásito hasta su extremo posterior gracias al motor actina-miosina del parásito, razón por la que también se conoce como Moving Junction (MJ) (Alexander et al., 2005; Baum et al., 2008; Straub et al., 2009). La formación del TJ le permite al parásito iniciar y llevar a cabo la invasión a la célula huésped, así como la formación de la vacuola parasitófora, en la cual el parásito se desarrolla y se replica para la próxima generación celular (Kaneko, 2007).

Recientemente, algunos autores han identificado en *Toxoplasma gondii* (otro miembro del filo *Apicomplexa*) las proteínas que participan en la formación del TJ, dentro de las que se encuentran las

proteínas Antígeno Apical de Membrana 1 (TgAMA1) y cuatro proteínas del cuello de las roptrias (TgRON2, 4, 5 y 8) (Alexander et al., 2005; Baum et al., 2008; Straub et al., 2009).

Besteiro y colaboradores han propuesto un modelo de interacción donde las proteínas TgRON2 y TgRON5 son exportadas hacia la membrana de la célula huésped, mientras que TgRON4 y TgRON8 son translocadas hacia el citoplasma celular. En este modelo, TgRON2 actúa como un receptor específico para TgAMA1, la cual se encuentra a su vez localizada en la membrana del parásito (Besteiro et al., 2009).

La presencia de genes ortólogos que codifican para las proteínas presentes en el TJ en diferentes miembros del filo *Apicomplexa*, sugiere que la formación del TJ es conservado en este filo (Proellocks et al., 2010). Las proteínas homólogas a TgRON2 y TgRON4 ya han sido caracterizadas en *Plasmodium falciparum* (Alexander et al., 2006; Cao et al., 2009; Morahan et al., 2009), mientras que para TgRON8 no se han encontrado homólogos en *Plasmodium* (Straub et al., 2009). Las proteínas PfRON3 y PfRON6 descritas recientemente, se localizan en el cuello de las roptrias pero no se encontró relación de ellas con la formación del TJ (Proellocks et al., 2009; Ito et al., 2011).

Aunque se ha considerado que la proteína PfRON5 participa en la formación del TJ (Collins et al., 2009; Richard et al., 2010), aún no ha sido caracterizada. En este trabajo, se secuenció el ADN codificante para la proteína PfRON5, se realizaron análisis bioinformáticos con la secuencia obtenida, se evaluó el tiempo de expresión y su localización celular en la cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria es una de las enfermedades parasitarias que produce mayor número de muertes en el mundo, principalmente en niños menores de 5 años, mujeres embarazadas y personas en edad productiva (WHO, 2008). Es causada por un parásito del género *Plasmodium*, del cual cinco especies infectan al hombre: *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. vivax* y *P. falciparum*, siendo la última la especie más agresiva y de mayor prevalencia mundial (WHO, 2009; Garcia, 2010).

Han sido grandes los esfuerzos que se han llevado a cabo para controlar la malaria, sin embargo, no se ha tenido un completo éxito. Dentro de las medidas de control propuestas para la completa erradicación de esta enfermedad se ha propuesto el desarrollo de una vacuna que incluya antígenos derivados de los diferentes estadios invasivos del parásito (Tsuji and Zavala, 2001; Matuschewski, 2006; Patarroyo and Patarroyo, 2008; Patarroyo et al., 2011).

El estudio de las proteínas relacionadas con los procesos de invasión es el primer paso para la identificación de los antígenos o fragmentos derivados de ellos, que puedan ser parte de una vacuna efectiva. Esto se ha logrado en gran parte gracias al conocimiento del genoma (Gardner et al., 2002), transcriptoma (Bozdech et al., 2003a) y proteoma de *P. falciparum* (Sims and Hyde, 2006; Foth et al., 2011), y de otros miembros del filo *Apicomplexa*, como *Toxoplasma gondii*; y al hecho de que el proceso de invasión es conservado entre los miembros de este filo (Proellocks et al., 2010).

Teniendo en cuenta lo que se ha publicado para la proteína TgRON5 (Alexander et al., 2005; Straub et al., 2009) y lo reportado en la base de datos PlasmoDB (Bahl et al., 2003), en este trabajo se propuso la identificación de la proteína PfRON5 en la cepa FCB-2 de *P. falciparum*, mediante la secuenciación de la región codificante, el análisis de su expresión en diferentes estadios parasitarios y su localización subcelular.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Identificar la proteína RON5 en la cepa FCB-2 de Plasmodium falciparum.

3.2. Objetivos Específicos

- 1. Confirmar la presencia y transcripción del gen Mal8P1.73 en la cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum*.
- 2. Determinar la variabilidad de la proteína PfRON5 de la cepa FCB-2, respecto a la cepa de referencia 3D7.
- 3. Analizar mediante herramientas bioinformáticas la secuencia primaria de la proteína PfRON5.
- 4. Evaluar la expresión de la proteína en diferentes estadíos parasitarios y determinar su localización.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Malaria en el mundo

La malaria es una parasitosis ampliamente distribuida, se estima que anualmente se presentan aproximadamente 250 millones de casos clínicos en todo el mundo, de los cuales se presentan alrededor de 900.000 muertes, siendo las principales víctimas niños menores de cinco años, mujeres embarazadas y adultos en edad productiva (Fig. 1) (WHO, 2008; WHO, 2009). Se conoce que cerca del 93% de los casos y el 85% de las muertes son causadas por *P. falciparum* (WHO, 2008; WHO, 2009).

Esta enfermedad se presenta en los países tropicales, principalmente en África, donde se reportan el 85% de los casos y el 95% de las muertes (Fig. 1).



Figura 1. Incidencia anual de malaria. La mayoría de casos nuevos se presentan en África. Las convenciones indican la incidencia por cada mil habitantes. Tomado de: (WHO, 2008)

4.2. Malaria en Colombia

En Colombia, la malaria es un gran problema de salud pública debido a su amplia distribución y número de casos reportados anualmente. Para final del 2010, se notificaron al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), del Instituto Nacional de Salud (INS), 112.208 casos de malaria, de los

cuales 78.964 (70,4%) corresponden a *P. vivax*, 31.774 (28,3%) a *P. falciparum*, 1.415 (1,3%) a la asociación de estas dos especies y 55 (0,05%) a *P. malariae* (INS, 2010) (Fig. 2).

Los departamentos con mayor incidencia de malaria son: Antioquia, Chocó, Córdoba, Valle y Guaviare, siendo en los tres primeros donde se presentan el 78,7% de los casos notificados en el país (Fig. 3).



Figura 2. Casos de malaria por municipio y especie parasitaria en Colombia. Datos correspondientes a la semana epidemiológica 49 de 2010. Tomado de: (INS, 2010).



Figura 3. Número de casos de malaria y porcentaje de casos según departamento de procedencia en Colombia. Datos correspondientes a la semana epidemiológica número 49 de 2010. Tomado de: (INS, 2010).

4.3. Estrategias de control

Entre los años 1950 y 1960 se llevó a cabo un programa de erradicación de la malaria mediante el uso del dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), el cual contó con mucho éxito en varios países como India, Sri Lanka y la antigua Unión Soviética. Sin embargo, este programa no se mantuvo debido a los altos costos, a la aparición de resistencia por parte del vector y a los efectos adversos en la salud de la población (Greenwood and Mutabingwa, 2002).

Dentro de los medicamentos utilizados para combatir la malaria, los de mayor uso han sido la cloroquina y la combinación de sulfadoxina/pirimetamina, sin embargo, se ha descrito la aparición de cepas resistentes a estos fármacos (Ridley, 2002) (Fig. 4).

Esta resistencia a los antimaláricos, además de la resistencia del vector a los insecticidas, junto con otros factores tales como la variabilidad genética, el complejo ciclo de vida del parásito, los cambios climáticos, los viajes de personas que viven en áreas libres de malaria hacia zonas endémicas y las condiciones socioeconómicas de las poblaciones afectadas, son razones para que la situación no mejore y los índices de morbilidad y mortalidad permanezcan casi siempre iguales, principalmente en África (Greenwood and Mutabingwa, 2002). Pero a la vez, son también razones que justifican la búsqueda de nuevas medidas de control que reduzcan al máximo el impacto de la malaria en la población. Se ha propuesto que una medida de control efectiva es la implementación de una vacuna multiantigeno multiestadio (Good, 2001; Greenwood and Mutabingwa, 2002; Patarroyo and Patarroyo, 2008; Patarroyo et al., 2011).



Figura 4. Estado global de la resistencia a cloroquina y sulfadoxina/pirimetamina. Se muestra la distribución de la resistencia hacia los antimaláricos más ampliamente utilizados. Modificado de: (Ridley, 2002).

La OMS, el Banco Mundial, la UNICEF y organizaciones no gubernamentales, grupos del sector privado, investigadores e instituciones académicas han extendido el programa "*Roll Back Malaria*", que se basa en el cumplimiento de cuatro componentes importantes: acceso a tratamiento oportuno, prevención de la malaria durante el embarazo, reducción del contacto mosquito-humano mediante el uso generalizado de mosquiteros tratados con insecticidas y la acción oportuna durante las epidemias de malaria (Suh et al., 2004). Este programa ha elaborado hojas de ruta para los países endémicos con el objetivo de proporcionar un sistema nacional, regional y mundial para el seguimiento de los progresos, la identificación de los problemas en la financiación y con los productos básicos, así como para facilitar la aplicación y movilización de recursos (WHO).

4.4. Agente etiológico

La malaria es causada por un parásito del género *Plasmodium* perteneciente al filo *Apicomplexa*. Los miembros de este filo son patógenos con gran importancia médica, veterinaria y económica e incluyen diversos parásitos humanos diferentes a *Plasmodium* como *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Isospora* y *Babesia*, y parásitos que infectan animales domésticos como *Theileria* y *Babesia* (ganado), *Eimeria* (aves de corral) *Sarcoscystis* (cerdos) y *Neospora* (perros) (Blackman and Bannister, 2001). Los miembros de este filo, se caracterizan por poseer un complejo apical que juega un rol crucial en el proceso de invasión a la célula huésped (Anantharaman et al., 2007).

En el caso del género *Plasmodium*, existen especies que parasitan reptiles, aves, mamíferos y algunos pueden o no causar enfermedad. A los humanos son cinco las especies que lo infectan: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. knowlesi* (Preiser et al., 2000; Topolska et al., 2004).

El género Plasmodium tiene un complejo ciclo de vida multiestadío que involucra un hospedero invertebrado en el cual el parásito realiza un ciclo sexual, y un hospedero vertebrado en el cual el parásito lleva a cabo el ciclo asexual (Suh et al., 2004). Brevemente, el ciclo en el humano comienza con la inoculación de esporozoitos a través de la picadura de un mosquito hembra del género Anopheles, los cuales viajan por el torrente sanguíneo e invaden a los hepatocitos en aproximadamente 15 min. Cada esporozoito se diferencia y se divide en miles de merozoitos (~ 30.000) que son liberados al torrente sanguíneo por medio de los merosomas (Baer et al., 2007). Como caso especial en P. vivax y P. ovale, algunos esporozoitos pueden diferenciarse a formas durmientes del parasito, denominadas hipnozoitos y que son responsables de recaídas (Markus, 2011). Los merozoitos liberados al torrente sanguíneo invaden eritrocitos y se desarrollan pasando por diferentes estadios: anillos, trofozoitos y esquizontes. Luego de madurar y al final del ciclo en el eritrocito (48 ó 72 horas dependiendo de la especie parasitaria) cada uno de los esquizontes libera aproximadamente 32 nuevos merozoitos, que a su vez invaden nuevos glóbulos rojos para mantener el ciclo eritrocítico. Algunos merozoitos dentro del glóbulo rojo se desarrollan en formas sexuales (gametocitos) que son ingeridos por la hembra del mosquito Anopheles al alimentarse de una persona infectada. En el intestino del mosquito, el gametocito macho fertiliza el gametocito hembra, generando cigotos que se convierten en móviles y alargados ooquinetes que invaden la pared del intestino medio del mosquito en el que se desarrollan en ooquistes. Los ooquistes crecen, se rompen, y liberan esporozoitos que se dirigen hacia las glándulas salivales del mosquito. La inoculación de los esporozoitos en otro huésped humano perpetúa el ciclo de vida del parasito (Carvalho et al., 2002) (Fig. 5).

De las cinco especies que infectan al humano, *P. falciparum* es sin duda la especie más agresiva, ya que cerca del 1% del total de los casos de malaria por esta especie genera el cuadro de malaria severa: fallas funcionales en diversos órganos vitales como pulmones, riñones, hígado y cerebro (Greenwood et al., 2005). Dos razones biológicas importantes que hacen esta especie muy virulenta, son su capacidad de exportar proteínas parasitarias a la superficie del glóbulo rojo infectado, permitiendo su adherencia a la microvasculatura periférica y la capacidad de invadir diferentes poblaciones de glóbulos rojos, tanto maduros como jóvenes, generando parasitemias más elevadas, y por consiguiente anemia más severa (Miller et al., 2002).



Figura 5. Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*. 1. Los esporozoitos presentes en las glándulas salivales del mosquito son inyectados en el momento de la picadura. 2. Estos migran al hígado, donde atraviesan las células de Kupffer e invaden a los hepatocitos. 3. Los esporozoitos se diferencian y se dividen en merozoitos, los cuales son liberados a torrente sanguíneo a través de los merosomas. 4. Fase eritrocítica: Los merozoitos invaden los eritrocitos donde pasan por diversos estadios: anillos, trofozoitos y esquizontes; o se convierten en formas sexuales no multiplicativas (gametocitos). 5. Los gametocitos son cruciales para perpetuar la enfermedad, al ser ingeridos por un mosquito cuando se está alimentando, llevan a cabo la fecundación en el tubo digestivo del mosquito formándose un cigoto. 6. El cigoto se convierte en un móvil y alargado ooquinete. 7. El ooquinete atraviesa la pared estomacal del mosquito donde se va a convertir en ooquiste. 8. Cuando madura, el ooquiste libera cientos de esporozoitos que migran a las glándulas salivales. 9. El mosquito continúa con la propagación de la infección al picar a otro huésped humano. Modificado de: (Greenwood et al., 2008).

4.5. El merozoito

El esporozoito y el merozoito son los únicos estadios en el huésped humano en los cuales el parásito de la malaria se encuentra de manera extracelular; haciéndolos un blanco visible para el sistema

inmune del hospedero. Es por esto que muchos estudios se han basado en estos estadios para el desarrollo de vacunas, buscando inhibir la unión y su ingreso, o su desarrollo dentro del hepatocito o glóbulo rojo, respectivamente (Preiser et al., 2000; Richie and Saul, 2002).

El merozoito tiene forma elipsoidal con una prominencia apical. Su ultraestructura ha sido descrita por técnicas de microscopia electrónica, mostrando que contiene la estructura básica de una célula eucariota: núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático, aparato de golgi, ribosomas, y además varios organelos secretores y un plasto o plastidio característicos. Los organelos secretores cruciales para la invasión a los eritrocitos, se diferencian entre sí por su forma, función y contenido de proteínas. Las roptrias (organelos en forma de pera, unidos a la membrana), los micronemas (cuerpos fusiformes, unidos al ducto de las roptrias), los gránulos densos y exonemas (estructuras redondeadas presentes en el polo apical), comprenden los organelos apicales (Fig. 6), y secretan de manera temporal y regulada diferentes moléculas durante la invasión del merozoito al eritrocito (Bannister et al., 2000; Carvalho et al., 2002; Kats et al., 2006).



Figura 6. Representación esquemática del merozoito. El merozoito tiene la estructura básica de una célula eucariótica, junto con los organelos apicales (Roptrias, Micronemas, Gránulos densos y exonemas), que le permiten llevar a cabo el proceso de invasión. Modificado de: (Bannister et al., 2000)

4.6. Invasión del merozoito al glóbulo rojo

Este proceso toma solo unos pocos segundos y se da gracias a la interacción de receptores específicos presentes en la membrana del eritrocito, capaces de reconocer ligandos en la superficie del merozoito. Este proceso ha sido dividido en tres fases:

• **Primera fase:** Implica una adhesión reversible y de baja afinidad con la célula huésped, e involucra proteínas de superficie del merozoito (MSPs por sus siglas en inglés). El punto de contacto inicial se puede presentar en cualquier región de la superficie del merozoito, de

manera que, si el polo apical del merozoito no está orientado hacia a la superficie del eritrocito, debe ocurrir la reorientación del parásito antes que se inicie la segunda fase. El propósito de este evento es yuxtaponer el extremo apical del merozoito con la membrana eritrocitaria, permitiendo una interacción mucho más fuerte (Cowman et al., 2002).

- Segunda fase: El contacto apical desencadena la secreción del contenido de los micronemas, exponiendo adhesinas y moléculas que se anclan a la superficie del merozoito para permitir el anclaje a la célula huésped. Esta función es llevada a cabo con la colaboración de proteínas del cuello de las roptrias. La unión estrecha formada entre las membranas del merozoito y la célula huésped es conocida como Tight junction (TJ). A partir de este anclaje la unión entre el parásito y el eritrocito es irreversible (Cowman and Crabb, 2006).
- Tercera fase: El MJ se desliza desde la parte apical hasta el extremo posterior del merozoito impulsado por el motor actina-miosina del parásito. A medida que el merozoito se invagina en la célula huésped, se da lugar a la formación de la vacuola parasitófora gracias a la secreción de proteínas provenientes del bulbo de las roptrias, formando un ambiente hospitalario para su desarrollo. Además, se da el procesamiento proteolítico de las proteínas del parásito que están sobre su superficie (cubierta superficial) y finalmente se presenta la secreción del contenido de los gránulos densos, permitiendo el establecimiento de la vacuola parasitófora (Cowman and Crabb, 2006; Kats et al., 2006).



Figura 7. Invasión del merozoito al glóbulo rojo. Se muestran las tres fases del proceso de invasión: **1.** Unión de baja afinidad y reorientación. **2.** Unión fuerte entre complejo apical del merozoito y membrana del eritrocito (Tight Junction). **3.** Ingreso del parásito y formación de la vacuola parasitófora. Modificado de: (Kats et al., 2006).

4.7. Tight junction en Toxoplasma

En general los miembros de filo *Apicomplexa* tienen procesos de invasión y ciclos de vida muy semejantes y presentan gran semejanza morfológica en cuanto a los organelos secretores (Fig. 8). Dentro de estos, *Toxoplasma gondii* es el parásito causante de la toxoplasmosis que afecta principalmente el desarrollo del feto en mujeres que se infectan durante el embarazo y a personas infectadas con VIH, linfoma u otros síndromes inmunológicos (Boothroyd and Dubremetz, 2008); es relativamente fácil de manipular in vitro, presenta buena eficacia en las transfecciones estables y transitorias, gran disponibilidad de marcadores celulares y cuenta con un modelo animal estandarizado. Por lo anterior, *Toxoplasma* ha sido utilizado como modelo para el estudio de otros miembros del filo *Apicomplexa*, entre ellos *Plasmodium* (Kim and Weiss, 2004; Baum et al., 2008).

Se ha descrito que el antígeno apical de membrana 1 (AMA1, por sus siglas en inglés) está presente en los miembros del filo *Apicomplexa* (Remarque et al., 2008). En *Plasmodium y Toxoplasma* la proteína AMA1, se localiza en los micronemas durante el desarrollo intracelular del parásito y justo antes de la invasión en la superficie del merozoito y del taquizoito respectivamente, lo que sugiere una posible función de unión a la célula huésped en el proceso de invasión (Narum and Thomas, 1994; Hehl et al., 2000). Lo anterior se evidenció, cuando se observó que la invasión a las células huésped se reduce significativamente en parásitos con knockout condicional para el gen *AMA-1* o en presencia de anticuerpos anti-AMA1 (Mital et al., 2005; Collins et al., 2009). Diferentes estudios muestran que AMA1 se localiza en el Tight Junction durante la invasión (Alexander et al., 2005; Lebrun et al., 2005; Alexander et al., 2006; Lamarque et al., 2011).



Figura 8. Comparación de la morfología celular del merozoito de *P. falciparum* y el taquizoito de *T. gondii*. Se observa que los organelos involucrados en el proceso de invasión: roptrias (azul cielo), micronemas (naranja) y gránulos densos (morado), a excepción de los exonemas (verde) son conservados. Se muestran otras estructuras como son el núcleo (NUC), complejo de la membrana interna (IMC), microtúbulos (MT), el anillo polar apical (APR) y algunas proteínas que se localizan en los organelos secretorios y en la superficie del parásito (ambas vinculadas y asociadas a la superficie). Tomado de: (Baum et al., 2008)

El Tight ó Moving Junction es la zona de unión irreversible en forma de anillo entre las membranas parasitaria y de la célula huésped rodeando al taquizoito formada durante la invasión (Fig 9). Esta zona se desplaza desde el extremo apical hasta el extremo posterior a medida que el parásito ingresa a la célula huésped, y se encuentra presente hasta el final del proceso de invasión por parte del parásito. (Proellocks, 2010).

Buscando determinar el rol funcional de AMA1, Alexander y colaboradores encontraron que tres proteínas derivadas del cuello de las roptrias del parásito se asocian con AMA1 en el TJ durante la invasión. Utilizando técnicas de inmunoprecipitación y espectrometría de masas identificaron las tres proteínas que corresponden a las proteínas del cuello de las roptrias (RONs, por sus siglas en inglés): TgRON2 (~145 kDa), TgRON4 (~130 kDa) y Ts4705 (~110 y 45 kDa debido a un procesamiento proteolítico) (Alexander et al., 2005; Bradley et al., 2005).

Estos resultados, similares a los obtenidos también por Lebrun y colaboradores (Lebrun et al., 2005), indican una cooperación entre proteínas (AMA1-RONs) de dos diferentes organelos (micronemas y roptrias) en el proceso de invasión.



Figura 9. Localización del Tight Junction durante la invasión. A. Taquizoito invadiendo una célula huésped. **B.** Detección de SAG1 (proteína de membrana) con FITC. **C.** Detección de RON4 con rojo Texas seguido de la permeabilización con saponina. **D.** Combinación de las imágenes B y C, se observa la forma de anillo en la tinción de una de las proteínas pertenecientes al complejo del Moving Junction justo en la zona de contacto entre membranas del taquizoito y la célula huésped, como muestran las flechas. Modificado de: (Alexander et al., 2005).

En un trabajo posterior, Straub y colaboradores caracterizaron las proteínas TgRON5, descrita previamente como Ts4705, y TgRON8 (>250 kDa) (sin homologo en *Plasmodium*) presentes en el complejo del TJ (Straub et al., 2009). TgRON8 es necesaria para el anclaje del parásito al citoesqueleto de la célula huésped, brindando estabilidad al complejo AMA1-RONs y permitiendo de esta manera la invasión (Straub et al., 2011).

Con el fin de establecer la localización especifica de las proteínas RONs durante la invasión, Besteiro y colaboradores, sometieron las células infectadas a permeabilización diferencial con estreptolisina-O, seguido de un marcaje específico por inmunofluorescencia de epítopes expuestos a la cara externa de

la membrana de la vacuola parasitófora. A partir de los resultados obtenidos, ellos proponen un modelo en el que TgRON2 y TgRON5 son exportadas a la membrana de la célula huésped, mientras que TgRON4 y TgRON8 son translocadas al citoplasma de esta célula. De esta manera, TgRON2 y TgRON5 tienen una región expuesta a la superficie de la célula huésped, y TgRON2 actuaría como un receptor específico para el ectodominio de TgAMA1 (Fig. 10) (Besteiro et al., 2009; Lamarque et al., 2011; Tyler and Boothroyd, 2011).



Figura 10. Representación esquemática de la organización del MJ. Izquierda: AMA1 es secretada de los micronemas a la superficie del parásito, mientras que las RONs son secretadas desde el cuello de las roptrias a la membrana de la célula huésped, forman un complejo y RON2 actúa como receptor para AMA1. Derecha: Vista detallada del modelo de interacción entre las proteínas del TJ. Aquí se muestra una topología putativa para las proteínas RON2 y 5, basados en la predicción de dominios transmembranales con la herramienta ConPred II. Tomado de: (Besteiro et al., 2009).

4.8. Tight Juntion en Plasmodium

Se ha demostrado que la maquinaria y el proceso de invasión de los miembros del filo *Apicomplexa* es conservado (Proellocks et al., 2010), de manera que los estudios en *Toxoplasma* han sido fundamentales para identificar las proteínas que hacen parte del TJ en *Plasmodium*.

Mediante microscopía electrónica de transmisión, los merozoitos de *Plasmodium falciparum* fueron visualizados en cada momento del ingreso a los eritrocitos, confirmando que las etapas de la invasión son similares a las definidas para otras especies de *Plasmodium* (Ladda et al., 1969; Bannister et al., 1975; Aikawa et al., 1978; Riglar et al., 2011). Con la microscopía, se observa que la formación del TJ ocurre por la interacción entre las membranas de la célula huésped y parasitaria, y que se presenta desde la porción apical hasta la porción posterior del merozoito a medida que este ingresa al eritrocito (Fig. 11).



Figura 11. Microscopía electrónica de la invasión del merozoito de *Plasmodium* a los eritrocitos. Al lado izquierdo se muestran las diferentes etapas de la invasión por microscopía electrónica y al lado derecho se muestran las etapas respectivas a manera de diagrama. **A.** Se observa el contacto inicial entre el polo apical del merozoito (flecha) y el eritrocito. Las dos flechas muestran la cobertura superficial del merozoito. **B.** Se observa un engrosamiento de la membrana del eritrocito en el sitio de unión (flecha), el merozoito inicia su ingreso al eritrocito **C.** El merozoito continúa el ingreso al glóbulo rojo, se observa claramente la zona de unión fuerte entre las membranas del eritrocito y del merozoito (c) y en el diagrama se observa la formación del anillo característico. **D.** Se observan fibras finas entre las dos membranas. La unión fuerte entre membranas (c) se mueve a medida que el merozoito ingresa al eritrocito. **E.** El TJ se localiza siempre en el orificio de entrada al eritrocito y a medida que ingresa el parásito la unión se localiza en una porción más posterior de este. **F.** El ingreso del merozoito al eritrocito casi se ha completado, se observa un orificio pequeño (flecha) en la porción posterior del merozoito, el TJ ahora se encuentra en la parte posterior del merozoito. E, entrada del merozoito; Mz, Merozoito; A, polo apical; R, roptria, N, núcleo; M, mitocondria; c, Tight Junction. Modificado de: (Aikawa et al., 1978).

Mediante ensayos de inmunoprecipitación y western blot utilizando anticuerpos dirigidos contra PfAMA1 (N5) y PfRON4 (24C6) se encontró que en *Plasmodium* al igual que en *Toxoplasma*, las proteínas PfRON4, PfRON2 y PfRON5 (Mal8P1.73) derivadas del cuello de las roptrias también se asocian con AMA1 en el TJ. En los inmunoprecipitados no se encontró la proteína homóloga a TgRON8, ni se encontraron secuencias homólogas en el genoma de *Plasmodium*, indicando su ausencia en este género (Figura 12) (Collins et al., 2009; Straub et al., 2009).



Figura 12. Inmunoprecipitación con anti-PfAMA1 y anti-PfRON4. El western blot muestra que los anticuerpos anti-PfAMA1 (N5) y anti-PfRON4 (24C6) inmunoprecipitan con las proteínas PfRON2, PfRON4, PfRON5 (Mal8P1.73) y AMA1. NMS (suero de ratón normal), AAPs (proteínas asociadas a AMA1). Tomado de: (Collins et al., 2009).

La inhibición de la invasión de merozoitos a eritrocitos producida por el anticuerpo 4G2 anti-AMA1 (Collins et al., 2007) o el péptido R1 que se une al surco hidrofóbico de AMA1 (Richard et al., 2010) que bloquean la unión entre AMA1 y las RONs muestran la importancia de la formación del TJ en *P*. *falciparum*.

Los ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal 4G2, dirigido contra un loop del dominio II de AMA1, muestran que AMA1 no co-precipita con las proteínas del cuello de las roptrias (RONs), sugiriendo que el anticuerpo 4G2 está dirigido contra la región de interacción entre AMA1 y las proteínas RONs (Fig. 13), evitando la formación del complejo y de esta manera la invasión. Sin embargo, se realizaron ensayos adicionales con la proteína AMA1 mutada y se identificó que la región de interacción entre AMA1-RONs corresponde al surco hidrofóbico del dominio I de AMA1, donde el residuo de tirosina en la posición 251 es crítico para la unión (Collins et al., 2009). Lo anterior indica que la inhibición de la invasión por parte del anticuerpo 4G2 no se presenta debido al bloqueo del sitio de interacción AMA1-RONs, sino a un impedimento estérico o a un cambio conformacional que impide la formación de esta interacción (Treeck et al., 2009) (Fig. 14).



Figura 13. El anticuerpo 4G2 no co-precipita con las proteínas RONs. El western blot muestra que el anticuerpo monoclonal anti-PfAMA1 no co-precipita con las proteínas asociadas a AMA1 (AAPs) o RONs. NMS (suero de ratón normal), N5 y 4G2 (anti-PfAMA1) y 24C6 (anti-PfRON4). Tomado de: (Collins et al., 2009).



Figura 14. Modo de acción propuesto para la inhibición de la invasión por parte del anticuerpo 4G2. a) El complejo de las RONs se une a la región hidrofóbica de PfAMA1 (representado en amarillo), donde la tirosina 251 juega un papel central. El anticuerpo 4G2 inhibe la unión de AMA1 al complejo de las RONs: b) Por impedimento estérico. c) Ó por la inducción o prevención de un cambio conformacional que afecta la integridad del surco hidrofóbico. DI, DII, DIII (dominios I, II y III del ectodominio de PfAMA1), CPD (dominio citoplásmico), AAPs (proteínas asociadas a AMA1). Tomado de: (Treeck et al., 2009)

Se ha propuesto que el péptido R1 se une al surco hidrofóbico de AMA1 en el dominio I, previniendo su interacción con las RONs. Esto evita la subsecuente secreción del contenido de las proteínas del bulbo de las roptrias, necesarias en la generación de la vacuola parasitófora y en últimas la invasión (Richard et al., 2010) (Fig. 15).



Figura 15. Inhibición de la invasión por parte del péptido R1. 1) El extremo apical del merozoito se pone en contacto con la membrana de los eritrocitos, y el complejo de las proteínas RONs se transloca a la membrana del eritrocito, 2a) Cuando AMA-1 se une con las proteínas RONs se desencadena la secreción de los contenidos de las roptrias para formar la vacuola parasitófora, 2b) Cuando el péptido R1 se une a AMA1, evita la interacción de AMA1 con el complejo de las RONs y no hay invasión.

Conociendo la importancia de la interacción AMA1-RONs y su participación en la formación del TJ y teniendo en cuenta lo descrito en *T. gondii*, en *P. falciparum* se han identificado las proteínas PfRON4 (Alexander et al., 2006; Morahan et al., 2009), PfRON2 (Cao et al., 2009), PfRON6 (Proellocks et al., 2009) y PfRON3 (Ito et al., 2011); de las dos últimas no se tiene evidencia de su presencia en el TJ (Proellocks et al., 2009; Ito et al., 2011). TgRON8 no tiene homólogo en *P. falciparum* (Straub et al., 2009) y aunque PfRON5 ha sido detectada en el TJ, hasta el momento no ha sido caracterizada.

5. HIPÓTESIS

El gen que codifica para la proteína PfRON5 está presente en el genoma de la cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum*, se transcribe y se expresa.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Tipo de estudio

El estudio desarrollado es de tipo experimental, en este trabajo, se identificó la proteína del cuello de las roptrias 5 en la cepa FCB-2 en *Plasmodium falciparum* (PfRON5) mediante métodos bioinformáticos y técnicas de biología molecular e inmunoquímica.

6.2. Metodología

6.2.1. Estudio del ADN genómico

6.2.1.1. Extracción del ADN del parásito

Se parte de un cultivo *in vitro* asincrónico de *Plasmodium falciparum* de la cepa FCB-2. La extracción de ADN se realizó con el kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, en el primer paso se lisan los glóbulos rojos mediante la adición de la solución de lisis celular; en el segundo paso se adiciona una solución de lisis nuclear; en el tercer paso mediante la adición de la solución de precipitación se remueven las proteínas quedando el ADN en el sobrenadante después de una centrifugación; y por último, el ADN es precipitado mediante la adición de isopropanol. Posterior a la extracción, se verificó la integridad del ADN genómico por gel de agarosa al 1% en TAE (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.002M, pH 8.5), teñido con SYBR[®] Safe (Invitrogen) (el cual se intercala entre las bases de ADN y permite su visualización con luz ultravioleta).

6.2.1.2. Amplificación del ADN genómico

Para la amplificación del ADN genómico, se utilizaron los siguientes primers: F4 5'-CATATCTATAAAAGTTGGAGG-3' y R4 5'- CAAATAATAAAAGAAAATGTAG-3', los cuales amplifican un fragmento de ~2400 pb, cubriendo aproximadamente las últimas 2100 pb del gen *PfRON5* y ~270 pb de región extragénica (Fig. 16). Se utilizó como control una región del gen *PfRON2* de ~2377 pb, de 6570 pb que tiene el gen completo. La amplificación se realizó con los siguientes primers: PfRON2-F3 5'-CGAATGACAGTATGCTAAATG-3' y PfRON2-R3: 5'-ATTAACATAGATGTAGAATTAGC-3'. Nota: Los primers utilizados en todas las reacciones de PCR en este trabajo fueron diseñados teniendo en cuenta la secuencia del gen Mal8P1.73, correspondiente a la secuencia de la cepa de referencia 3D7 obtenida de la base de datos PlasmoDB (<u>www.plasmodb.org</u>). Para su diseño se utilizó el programa Gene Runner y se les realizó un análisis por BLAST con el fin de descartar la hibridación con otras secuencias.



Figura 16. Primers de amplificación ADN genómico. Se amplificaron aproximadamente las ultimas 2000 pb del ADN genómico total (~7669 pb) utilizando los primers F4 y R4.

Las condiciones utilizadas fueron las siguientes, utilizando la enzima KAPA HiFi™ HotStart (KAPA BIOSYSTEMS), y siguiendo las instrucciones del fabricante:

Reactivo	Concentración final	Volumen
2x KAPA HiFi	1X	12.5 µI
Ready Mix	174	12,5 µ
Agua		7,5 μL
Forward (5 µM)	0,3 μΜ	1,5 µL
Reverse (5 µM)	0,3 μΜ	1,5 µL
ADNg		2 µL
Volumen final		25 µL

El programa en el termociclador fue:

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	95℃	5 min	1
Denaturación	98°C	20 s	
Anillaje	54°C	15 s	35
Extensión	72°C	2 min y 30 s	
Extensión final	72°C	5 min	1

6.2.2. Estudio de la transcripción del gen que codifica para PfRON5

6.2.2.1. Extracción de ARN

El ARN fue extraído de esquizontes provenientes de un cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum* de la cepa FCB-2, por el método de trizol (Chomczynski, 1993). Este método tiene cinco pasos: 1) Homogenización: se adiciona 1 mL de reactivo de TRIzol[®] (Invitrogen) por 5-10x10⁶ células aproximadamente y se mezcla por pipeteo. Este reactivo es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que mantiene la integridad de ARN mientras lisa las células y disuelve los componentes celulares. 2) Formación de las fases: se adiciona 0,2 mL de cloroformo por 1 mL de reactivo de TRIzol[®]. Después de centrifugar se observan dos fases por diferencia de densidad; la fase fenólica orgánica, contiene al ADN y restos de proteínas desnaturalizadas, y la fase superior acuosa que contiene el ARN. 3) Precipitación de ARN: la fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo y se adiciona 0,5 mL de isopropanol por mL de TRIzol[®], se incuba por 10 min. a 4°C y se centrifuga. 4) Lavado del ARN: se adiciona 1 mL de etanol al 75% por mL de TRIzol[®], se mezcla por vortex y se vuelve a centrifugar. 5) Resuspensión del ARN: El pellet de ARN se resuspende en 20-50 µL de agua libre de RNAsas por pipeteo, se incuba 10 min. de 55 a 60°C y se almacena a -70°C.

6.2.2.2. Síntesis de ADN copia (ADNc)

La síntesis se llevó a cabo con la enzima Super-Script III (Invitrogen) con primers random, los reactivos fueron utilizados de la siguiente manera:

Reactivo	Volumen
ARN	5 µL
Primers random	1 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
Agua	3 μL
Volumen final	10 µL

Se colocó la mezcla en el termociclador con un programa de 65°C por 5 min y posteriormente se incubó en hielo 1 min.

Luego, se agregaron los siguientes reactivos:

Reactivo	Volumen
Buffer (10X)	2 µL
$MgCl_2(25mM)$	4 μL
DTT	2 μL
RNAsa out	1 µL
Super Script III	1 µL
Volumen final	10 µL

Se llevó al termociclador de nuevo con un programa de 60 min a 50°C y se inactivó la enzima a 70°C. Por último, se adicionó 1µL de RNAsa H y se incubó a 37°C por 20 min.

6.2.2.3. Amplificación ADNc de PfRON5

Se realizó la amplificación específica del transcrito completo de PfRON5 (~3468 pb). Se probaron diferentes diluciones del ADNc: 1/5, 1/10 y 1/20, obteniéndose el producto esperado en las dos últimas diluciones. Los primers utilizados fueron: pEXP5-F (5'-ATGTTGAAATACACTTTGCTCAT-3') y pEXP5-R (5'-AGGTATTCTAGTGTGTACAATAA-3'), y se usó la enzima TAQXpediteTM (EPICENTRE Biotechnologies). Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Reactivo	Concentración final	Volumen
TAQXpedite PCR master Mix	1X	12,5 μL
Agua		6,5 μL
Forward (5 µM)	0,5 μΜ	2,5 μL
Reverse (5 µM)	0,5 μΜ	2,5 μL
ADN copia dil. 1/20		1 µL
Volumen final	-	25 μL

El programa en el termociclador fue:

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	95°C	30 s	1
Denaturación	95°C	10 s	
Anillaje	60°C	10 s	35
Extensión	72°C	2 min	
6.2.2.4. Purificación del producto de PCR obtenido de la amplificación del ADNc.

El kit empleado para la purificación fue UltraCleanTM PCR Clean-upTM de MO BIO Laboratories, Inc. El protocolo utilizado fue el recomendado por el fabricante. En resumen, se agregan 5 volúmenes de solución salina tamponada (SpinBind) al producto de PCR con el fin de mantenerlo en un rango de pH entre 6-7,5 para la eliminación de los primers. Luego esta mezcla se transfiere a un filtro (spin filter unit) y se centrifuga, quedando adherido el ADN a la membrana del filtro y eliminando componentes de la reacción de PCR como dNTPs y enzima. Posteriormente, se agrega una solución de lavado a base de etanol para eliminar rastros de contaminantes y se centrifuga. Por último, se adiciona buffer de elución (Tris 10mM) para desprender el ADN purificado de la membrana del filtro.

Los productos de PCR purificados se corrieron en un gel de agarosa utilizando un patrón de peso molecular (Hyperladder III, BIOLINE).

6.2.2.5. Adenilación.

Para realizar más adelante la clonación tipo TA-cloning y debido a que la enzima Taq polimerasa que se empleó para la amplificación no adiciona una adenina al final de producto amplificado, es necesario adenilar. Para esto, se utilizaron las siguientes condiciones, utilizando la enzima BIOLASETM (BIOLINE):

Reactivo	Volumen
Producto de PCR	4 μL
Buffer (10X)	1 μL
MgCl ₂	0,5 µL
dATPs	2 μL
ADN polimerasa	1 µL
Agua	1,5 µL
Volumen final	10 µL

Se llevó al termociclador con un programa de 45 min a 70°C.

6.2.2.6. Ligación

El producto de PCR purificado se ligó al plásmido pEXP5- CT/TOPO® TA (Invitrogen); para ello se utilizó un kit con el mismo nombre, el cual tiene una topoisomerasa I del virus *Vaccinia* que reconoce

la secuencia específica CCCTT y cliva el enlace fosfodiéster en una hebra. La energía por el rompimiento del enlace se conserva por la formación de un enlace entre el fosfato 3' de la hebra clivada y un residuo tirosil (Tyr-274) de la topoisomerasa I. Este enlace puede ser atacado por un hidroxil 5' de la hebra clivada, revirtiendo el proceso y liberando la topoisomerasa. Este mecanismo es utilizado para obtener mayor eficiencia en la clonación (Invitrogen, 2005-2006) (Fig. 17).



Figura 17. Acción de la topoisomerasa I en el kit pEXP5- CT/TOPO® TA (Invitrogen). Nótese que el residuo 274 de tirosina actúa en la formación del enlace con la hebra clivada.

Para la ligación se utilizaron las siguientes condiciones:

Reactivo	Volumen
Producto de PCR	4 µL
Solución Salina	1 μL
Agua	0,5 µL
Vector TOPO [®]	0,5 µL
Volumen final	6 µL

Luego se dejó 45 min a temperatura ambiente.

6.2.2.7. Transformación

Una vez realizada la ligación, se procedió a introducir el plásmido a un sistema bacteriano con el objetivo de obtener varias copias de éste que contengan la región codificante del gen de interés (*PfRON5*); para ello, se utilizaron células competentes de *E. coli* (TOP10). Brevemente, se mezclaron 2 μ L de la reacción de ligación con 100 μ L de las células competentes y 100 μ L de KCM (KCl 3M, CaCl₂ 1M, MgCl₂ 1M) en hielo por 20 min, luego se realizó un choque térmico colocando la reacción a 42°C por 30 s para permitir la entrada del plásmido a la bacteria; pasado este tiempo, se puso en hielo nuevamente por 5 min. Se adicionaron 250 μ L de medio S.O.C. y se llevó al shaker a 200 rpm, 37°C por 1 h. Por último se plaqueó en agar LB (Luria Bertani) con ampicilina como medio de selección debido a que el vector confiere el gen de resistencia a este antibiótico (Fig. 18). Las cajas se colocaron a 37°C toda la noche.



Figura 18. Carta del vector pEXP5- CT/TOPO® TA (**Invitrogen**). Se observa el gen que confiere la resistencia a ampicilina y la región donde queda insertado el producto de PCR de interés.

Se realizó una PCR de colonia para confirmar las colonias recombinantes. Se utilizaron primers: T7 (del vector) (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y E8 (interno) (5'-TAAAACGACATCAGCACTAG-3'), con un fragmento esperado de 1300 pb. Se utilizaron las siguientes condiciones con la enzima BIOLASETM (BIOLINE):

Reactivo	Concentración final	Volumen
Agua	-	4,4 μL
Buffer 10X	0,4X	1 µL
MgCl ₂ 50mM	1mM	0,5 µL
Τ7 (5 μΜ)	0,2 μΜ	1 μL
E8 (5 µM)	0,2 μΜ	1 µL
dNTPs (1,25mM)	0,1 mM	2 μL
Enzima 500 U	2 U	0,1
Volumen final	-	10 µL

El programa en el termociclador fue:

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	95℃	5 min	1
Denaturación	98°C	20 s	
Anillaje	54°C	15 s	35
Extensión	72C	2 min y 30 s	
Extensión final	72°C	5 min	1

6.2.2.8. Extracción y purificación del ADN plasmídico

Las colonias recombinantes se sembraron en 6 mL de medio líquido Luria Bertani (LB) con ampicilina toda la noche y luego se les adiciono glicerol para su conservación (la mezcla es 850 µL de cultivo y 150µL de glicerol estéril y se almacenaron a -70°C). Posterior a ello se realizó la extracción y purificación del ADN plasmídico utilizando el kit Ultra Clean 6 Minute Plasmid prep (MOBIO Laboratories). Este procedimiento involucra la centrifugación de las bacterias por 10 min a 13000 rpm, para luego descartar el sobrenadante. El pellet celular es resuspendido en la solución de resuspensión que contiene RNAsa, posteriormente se realiza la lisis alcalina de las bacterias adicionando la solución de lisis que contiene SDS para denaturar las proteínas de membrana y efectuar la lisis y tiene pH 12 en el cual la RNAsa es activa. Seguido a esto, se adiciona la solución de neutralización (acetato de potasio) que forma un precipitado cuando interactúa con el SDS, el cual a su vez, co-precipita con las proteínas denaturalizadas. Al centrifugar, las proteínas quedan en el pellet. Se pasa el sobrenadante a un filtro, de manera que el ADN quede adherido a este. Luego, se adiciona una solución con 10mM de Tris pata eluir de ADN del filtro.

Se verificó la integridad y se observó la concentración del ADN plasmídico en geles de agarosa al 1% teñido con SYBR[®] Safe (Invitrogen), utilizando un patrón de peso molecular (Hyperladder III, BIOLINE).

6.2.2.9. Secuenciación

El ADN plasmídico obtenido es enviado a secuenciación automática a Macrogen Inc (Seoul, Korea), usando los primers del vector: T7 Forward 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' y pEXP5-CT-Secrev 5'-CAAGGGGTTATGCTAGTTAT-3', y los siguientes primers internos: 1R 5'-TAAAACGACATCAGCACTAG-3', 2F 5'-TCAAAAAACGGCACAAAGAAG-3', 2R 5'-TATCAACGGCAATTCTTAAAAT-3' y 3F 5'-ACAAAGATAAGTATAAGAAAAC-3' (Fig. 19).



Figura 19. Representación gráfica de los primers utilizados para secuenciación del ADNc de PfRON5. Se muestran los primers distribuidos a lo largo de la secuencia del ADN copia de ~3468 pb. Se utilizaron dos primers externos sobre la secuencia del vector para evitar la pérdida de los primeros y últimos nucleótidos en la secuenciación.

6.2.3. Estudio bioinformático

La secuencia del ADN genómico reportada en base de datos PlasmoDB fue analizada con el software Spidey (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey</u>) para predecir el número de exones. La búsqueda de secuencias homólogas a PfRON5 en otros miembros del filo *Apicomplexa* y en otra especies de *Plasmodium* se realizó mediante la herramienta BLASTP de las bases de datos de NCBI y EuPath (Altschul et al., 1990; Aurrecoechea et al., 2007).

En este trabajo, los alineamientos realizados, tanto para nucleótidos como para aminoácidos se realizaron con la herramienta Clustal W (Thompson et al., 1994). Para establecer el grado de homología entre cada secuencia encontrada y PfRON5, teniendo en cuenta el porcentaje de identidad y similitud, se utilizó el software clustalW pairwise del EBI (http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/).

Para la construcción de árboles filogenéticos de aminoácidos con las secuencias homólogas encontradas se utilizaron los métodos de Neighbor Joining, Máxima Parsimonia y Mínima Evolución (Cavalli-Sforza, 1967; Saitou and Nei, 1987; Nakhleh et al., 2005), incluidos en el software Mega 4.0 (Tamura et al., 2007). Cada método se corrió con el modelo de Poisson, con 1000 réplicas de Bootstrap (para asignar valores de confianza a los nodos de las ramas de los árboles), y teniendo en cuenta los gaps (pairwise deletion) o ignorando los gaps (complete deletion).

La búsqueda de péptido señal se realizó con Polyphobius e InterProScan (Kall et al., 2005; Quevillon et al., 2005) y la búsqueda de dominios transmembranales (TMs) se realizó con los predictores: Phobius, TMpred, TMHMM, ConpredII y Polyphobius (Hofmann K and Stoffel, 1993; Krogh et al., 2001; Arai et al., 2004; Kall et al., 2004; Kall et al., 2005).

6.2.4. Obtención de anticuerpos anti-PfRON5

6.2.4.1. Selección y síntesis de los péptidos a inocular

Con el fin de obtener anticuerpos dirigidos hacia la proteína PfRON5 y llevar a cabo estudios posteriores de expresión, se seleccionaron 3 péptidos para sintetizarlos e inocularlos en conejos. La

selección de los péptidos se realizó teniendo en cuenta dos programas de predicción para epítopes B: ANTHEPROT, el cual involucra parámetros de antigenicidad de Parker, hidrofilicidad y accesibilidad al solvente (Deleage et al., 2001) y BepiPred, el cual a partir de modelos ocultos de Markov, predice los residuos que pueden ser parte de un epítope lineal para células B (Larsen et al., 2006). Teniendo en cuenta los péptidos con mejores puntajes para los dos programas, se seleccionaron 3 péptidos de 20 residuos cada uno, localizados a lo largo de la proteína (en la región N-terminal, C-terminal y en el centro). Los péptidos escogidos se sintetizaron por medio de síntesis múltiple en fase sólida t-Boc/Bzl (Merrifield, 1963; Houghten, 1985), y se analizaron por cromatografía liquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y espectrometría de masas MALDI-TOF. A cada péptido se le adicionaron residuos de glicina y cisteína en la región N y C terminal para permitir la polimerización (Lioy et al., 2001).

6.2.4.2. Esquema de inmunización

Dos conejos Nueva Zelanda fueron inoculados intramuscularmente con una mezcla de los 3 péptidos escogidos (250 µg por péptido), emulsificados con adyuvante completo de Freund para la primera dosis. Para las dosis siguientes se utilizó adyuvante incompleto de Freund, las cuales se efectuaron en los días 20 y 40 después de la primera inoculación. Se obtuvo sangre total de los conejos antes de la primera inmunización (pre-inmune), y 20 días después de cada inmunización (post-primera, post-segunda e hiper-inmune, respectivamente). Luego de centrifugar dos veces se obtuvo el suero de los conejos con anticuerpos policionales contra los péptidos inoculados.

6.2.4.3. Adsorción de los sueros de conejo

Los sueros de conejo obtenidos fueron adsorbidos pasándolos por columnas del sefarosa acopladas con sonicado de *Escherichia coli*, lisado de eritrocitos de conejo y al péptido sintético SPf66 (Patarroyo et al., 1987); con el fin de eliminar anticuerpos inespecíficos.

Para la preparación del sonicado de *E. coli*, un inóculo de la cepa DH5a se puso a crecer toda la noche en medio LB. Al día siguiente se obtuvieron las bacterias por centrifugación, se resuspendieron en un coctel de proteasas (Pepstatina, leupeptina, PMSF, RNAsa, DNAsa, lisozima), y se incubaron en agitación por 25 min a 37°C. Se sonicó por 3 min a 80% de amplitud, se centrifugó y el sobrenadante fue resuspendido en buffer de acoplamiento (NaHCO3 al 1.0 M y NaCl al 0.5 M pH 8.3). Para la preparación de los eritrocitos de conejo, se aislaron eritrocitos de conejos sin inocular y se lisaron con saponina al 0,2% (Sigma) y también se resuspendieron en buffer de acoplamiento.

El sonicado de *E. coli*, el lisado de eritrocitos de conejo y el péptido sintético SPf66 (Patarroyo et al., 1987; Patarroyo et al., 1988) fueron acoplados de manera individual a una columna de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) (Amersham Biosciences) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se disuelve el ligando (sonicado, lisado y péptido) en buffer de acoplamiento (5mL/g de polvo seco), teniendo en cuenta que por mL de columna se necesitan 5 mg de proteína. Se adiciona esta solución a la resina activada previamente con HCl 1mM y se deja toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente se hacen lavados con buffer de acoplamiento, se adiciona buffer de bloqueo (Tris-HCl 0.1M pH 8), y se deja en agitación 2h a temperatura ambiente. Se realizan 5 lavados utilizando soluciones alternadas de pH: pH 4 (CH₃COONa 0.1M, NaCl 0.5M) y pH 8 (Tris-HCl 0.1M, NaCl 0.5M).

Los sueros obtenidos de los conejos por las respectivas sangrías fueron adsorbidos con estas columnas con el fin de remover anticuerpos inespecíficos.

6.2.4.4. Inmunogenicidad de los péptidos inoculados.

Para determinar la inmunogenicidad de los péptidos inoculados se realizó un ensayo de ELISA. Para este ensayo se llevó a cabo el siguiente procedimiento: 1) las placas de ELISA fueron recubiertas con 10 µg/mL de cada uno de los péptidos inoculados (36924, 36923 y 36926) y se incubaron a 37 °C por 1 h, toda la noche a 4 °C, y de nuevo a 37 °C por 1h. 2) Las placas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0.05% y se incubaron con 0.5% de leche descremada en PBS-Tween 0.05% por 1h a temperatura ambiente. 3) Los sueros (69 y 73) fueron adicionados a la placa por duplicado en una dilución 1:100, se incubó por 1 h a 37 °C y se lavó 5 veces con PBS-Tween 0.05% para remover el exceso de anticuerpo no unido a los péptidos. 4) Se adicionó un anticuerpo tipo IgG de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (Vector Laboratories) diluido 1:5000 y se incubó 1 h a 37 °C, se realizaron de nuevo 5 lavados. 5) Se reveló con el kit TMB Microwell Peroxidase Substrate System (KPL Laboratories). Las absorbancias fueron leídas a 620 nm en un lector de ELISA (Lab Systems Multiskan MS).

6.2.5. Análisis de la expresión de la proteína PfRON5.

6.2.5.1. SDS-PAGE y western blot

Partiendo de un cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum* de la cepa FCB-2 sincronizado con sorbitol, se obtuvieron eritrocitos infectados con parásitos en varios estadios del ciclo eritrocítico:

anillos (4–8 h), trofozoitos jóvenes (19–24 h), trofozoitos maduros (26–31 h), esquizontes (42–47 h) y merozoitos libres (Mz). Los eritrocitos infectados con cada estadio parasitario fueron lavados con PBS, lisados con saponina al 0.2% (Sigma), y tratados con buffer de lisis (PMSF 100 mM, SDS al 20%, EDTA 0.5M pH 8.3 y yodoacetamida 100 mM). Las proteínas de cada lisado fueron cuantificadas con el método micro-BSA (Thermo Scientific).

La separación de proteínas de cada estadio del parásito fue realizada en un gel de poliacrilamida al 5% bajo condiciones denaturantes. Se sembraron 2 mg de proteína para cada gel y se corrieron a un voltaje constante de 120 voltios (v). Luego se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot, Bio-Rad) por 200 min a 12 v, la cual fue confirmada con la coloración con rojo Ponceau.

Para el análisis por western blot, la membrana transferida de nitrocelulosa fue bloqueada con leche al 5% en TBS-Tween (TBS-T) 0.05% y lavada con TBS-T. Los sueros pre-inmunes e hiper-inmunes fueron adicionados cada uno a una tira de membrana transferida en una dilución de 1:40 en solución bloqueadora por 1 h. Después de realizar lavados con TBS-T, se adicionó un anticuerpo de cabra tipo IgG anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina en dilución 1:5000 (ICN Biomedicals) y se volvió a incubar por 1h. Seguido a esto, se adicionó la solución activadora (Tris-HCl 100mM, NaCl 150 mM y MgCl₂ 1mM) por 20 min, y la detección se realizó con el kit NBT/ BCIP (Promega).

La especificidad del reconocimiento de los sueros anti-péptidos por los péptidos inoculados se determinó en un ensayo similar al anterior, excepto que los sueros hiper-inmunes fueron incubados con una mezcla de 400 mM de cada péptido inoculado por 1 h a 37°C antes de ser adicionados en el western blot.

6.2.5.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se realizaron extendidos de glóbulos rojos infectados con *Plasmodium falciparum* (cepa FCB-2) provenientes de un cultivo *in vitro* con 5% de parasitemia (esquizontes maduros). Los extendidos se dejaron secar y se guardaron a -70°C, con el fin de obtener antígeno adecuado para realizar la inmunofluorescencia.

Para la IFI, los extendidos se fijaron con formaldehído al 4% por 10 min, se permeabilizó con Tritón X-100 al 0.1% (Sigma) en PBS y se bloqueó con BSA-PBS 1% por 30 min a 37 °C. Posteriormente, los sueros de conejo previamente preabsorbidos se utilizaron como anticuerpo primario en una

dilución 1:40 en PBS–BSA 1%. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de cabra tipo IgG anti-conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Vector Laboratories) en una dilución 1:30 en PBS-BSA 1%, seguido de la adición de 2 μ g/mL de DAPI (Sigma). Las láminas fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Las imágenes se obtuvieron con una cámara Olympus DP2 y se realizó la sobreposición de las imágenes con el software Volocity (Perkin Elmer).

6.2.5.3. Microscopía Inmunoelectrónica.

Para la preparación de las láminas, se obtuvieron merozoitos del cultivo *in vitro* de la cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum* y se centrifugaron a 1000 rpm por 2 min. Se eliminó el sobrenadante, al pellet se le adicionó paraformaldehído 4% y glutaraldehído 0,5%. Se retiró la solución anterior y se adicionó etanol al 50%, al 70%, al 90% y al 100% cada una por 15 min. Inmediatamente, se dejó en etanol y resina (LR white) en relación 1:1 toda la noche. Al día siguiente se dejó en resina al 100% toda la noche. Luego, se hizo el cambio por una resina nueva y se dejó a 37°C por 48 h, hasta que polimerizara. Por último, se realizaron cortes ultrafinos de 60 nm, los cuales fueron montados sobre rejillas de níquel de 300 mesh cubiertas con membranas de soporte de colodión.

Para el inmunomarcaje, se realizó un bloqueo con SFB 5%-Tween 20-1%. Como anticuerpo primario se utilizó el suero 73 y se incubó 1h a 4 °C. Seguidamente, se adicionó un anticuerpo tipo IgG anticonejo acoplado a perlas de oro de 10 nm y se dejó 1h a temperatura ambiente. Por último, se adicionó el líquido de contraste (6% acetato de uranilo) por 5 min antes de realizar la lectura en el microscopio electrónico de transmisión Hitachi Hu-12A.

7. ASPECTOS ÉTICOS

Para la elaboración de este trabajo, se utilizaron dos conejos Nueva Zelanda con el fin de obtener anticuerpos policionales contra péptidos derivados de la proteína PfRON5. El manejo de estos animales, se realizó teniendo en cuenta el título V: La investigación biomédica con animales, de La Resolución Número 8430 de 1993, proclamada por el Ministerio de salud de Colombia. La Declaración Universal de los derechos del animal, proclamada el 15 de octubre de 1978 y aprobada por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) y, posteriormente, por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), y el Estatuto Nacional de Protección animal (Ley 84 de 1989), proclamada por el Congreso de la República de Colombia.

8. RESULTADOS

8.1. Obtención del ADN parasitario y amplificación del gen PfRON5

El ADN genómico extraído fue evaluado en un gel de agarosa al 1% (Fig. 20A), donde se observa buena concentración de ADN y la ausencia de degradación. Posteriormente, se amplificó un fragmento de ~2400 pb utilizando primers específicos, cubriendo las últimas ~2100 pb del gen *PfRON5* y ~270 pb de región extragénica (Fig. 20B).



Figura 20. Extracción del ADN genómico y amplificación de un fragmento del gen *PfRON5*. A. Se observan tres extracciones de ADN con el kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega). B. Amplificación del gen *PfRON5*, se observa una banda con el peso esperado de ~2400 pb en el carril 1, correspondiente a un fragmento del gen *PfRON5*, En el carril 2, se observa el control positivo correspondiente a un fragmento del gen *PfRON2* de un peso esperado de ~2377 pb. Carril 3: control negativo.

8.2. Estudio de la transcripción del gen que codifica para PfRON5

8.2.1. Amplificación ADNc de PfRON5

Se llevó a cabo la amplificación del ADNc de *PfRON5*, la cual fue evaluada en un gel de agarosa al 1%, donde se observa una banda de ~3468 pb correspondiente con el peso esperado para el ADNc en su totalidad (Fig. 21).



Figura 21. El gen que codifica para PfRON5 se transcribe. La línea 1 muestra un producto amplificado de ~3468 pb, la línea 2 muestra el patrón de peso molecular.

8.2.2. Clonación

La región codificante del gen *PfRON5* obtenida por la amplificación específica del ADNc sintetizado, se insertó en el vector pEXP5- CT/TOPO® TA (Invitrogen) y con este plásmido se transformaron bacterias competentes TOP10 de *E. coli*. En la transformación se obtuvieron varias colonias blancas, se tomaron 10 colonias y a cada una se les realizó PCR, obteniendo un producto esperado de amplificación de 1300 pb (Fig. 22). Se escogieron al azar 3 de las colonias recombinantes de PCRs independientes para extraer el ADN plasmídico, el cual fue evaluado mediante gel de agarosa (Fig. 23) y fueron enviados a secuenciación.



Figura 22. Confirmación de las bacterias recombinantes. Los carriles del 1-10 corresponden a la amplificación de 10 colonias transformadas, de las cuales nueve de diez colonias fueron positivas, con un producto esperado de ~1300 pb, PPM: patrón de peso molecular.





8.2.3. Análisis de la secuencia PfRON5.

El ADN plasmídico proveniente de tres PCR originales diferentes se envió a secuenciar con el fin de obtener una secuencia consenso para la secuencia codificante del gen *PfRON5* en la cepa FCB-2. Se consideró que existía un cambio en la secuencia respecto a la secuencia de la cepa de referencia 3D7 cuando el cambio estaba presente en los 3 clonos secuenciados. La secuencia consenso se reportó en la base de datos del GenBank con el número de acceso HQ424431.

El alineamiento de la secuencia consenso de la cepa FCB-2, junto con la cepa de referencia 3D7 muestra cuatro sustituciones nucleotídicas que producen el cambio en tres aminoácidos: Pro92Ser, Phe266Leu y Glu1015Asp.

Adicionalmente, se envió a secuenciar la región codificante del gen *PfRON5* en la cepa Pas-2 a partir de producto de PCR. Al realizar el alineamiento entre las cepas FCB-2, Pas-2 y 3D7 de referencia, se encontraron los mismos cambios observados anteriormente para la cepa FCB-2 y un cambio adicional: Gln848Arg (Tabla 1 y anexo 1). Esto indica alto grado de conservación de la proteína en estas cepas de *Plasmodium falciparum*.

Nucle	ótidos	Amino	ácidos
Posición	Cambio	Posición	Cambio
274	C/T	92	P/S
798	C/A	266	F/L
2058	A/C	686	Т
2543	A/G	848	Q/R
3045	A/T	1015	E/D

Tabla 1. Cambios en la secuencia del ADNc y de la proteína de PfRON5 de las cepas FCB-2 y Pas-2, respecto a la cepa de referencia (3D7).

 Tabla 1. Para la cepa FCB-2, se encontraron 4 sustituciones de nucleótidos correspondientes a tres cambios de aminoácidos,

 para la cepa Pas-2, se encontraron los mismos cambios con una sustitución adicional resaltada en rojo.

8.3. Estudio bioinformático.

Según lo reportado en PlasmoDB, el gen Mal8p1.73 que codifica para la proteína PfRON5, se encuentra localizado en el cromosoma 8 y tiene una longitud de ~7669pb, el cual se trascribe en un ARN mensajero de 3471pb. Los resultados del software Spidey y lo observado en PlasmoDB muestran que este gen tiene 31 exones (Tabla 2 y Fig. 24).



Figura 24. Representación esquemática del ADN genómico. Se muestra la distribución de los 31 exones a lo largo de la secuencia de 7669 pb La flecha indica el sentido de la transcripción.

La búsqueda de secuencias homólogas al gen Mal8P1.73 por BLASTP permitió encontrar homólogos en las siguientes especies de *Plasmodium* (códigos de la base de datos PlasmoDB): *P. vivax* cepa Sal-1 (PVX_089530), *P. knowlesi* cepa H (PKH_051420), *P. berghei* cepa ANKA (PBANKA_071310), *P. yoelii* cepa 17XNL (PY02282), y *P. chabaudii* (PCHAS_072220). Y se encontraron los siguientes homólogos en otros géneros (códigos del NCBI): *Babesia bovis* (XP_001611063.1), *Theileria annulata* (XP_953613.1), *Theileria parva* cepa Muguga (XP_766682.1), *Toxoplasma gondii* (ACY08774.1), y *Neospora caninum* (NCLIV_055360, base de datos ToxoDB).

Organización de los exones en el gen PfRON5.										
Número de exón	ADN (pb)	ARN (pb)	Longitud (pb)							
Exon 1	1-60	1-60	60							
Exon 2	168-245	61-138	78							
Exon 3	381-494	139-252	114							
Exon 4	779-811	253-285	33							
Exon 5	988-1014	286-312	27							
Exon 6	1163-1351	313-501	189							
Exon 7	1505-1564	502-561	60							
Exon 8	1666-1740	562-636	75							
Exon 9	1938-2003	637-702	66							
Exon 10	2146-2226	703-783	81							
Exon 11	2371-2493	784-906	123							
Exon 12	2584-2664	907-987	81							
Exon 13	2779-2901	988-1110	123							
Exon 14	3026-3219	1111-1304	194							
Exon 15	3419-3809	1305-1694	390							
Exon 16	4033-4407	1695-2069	375							
Exon 17	4539-4916	2070-2447	378							
Exon 18	5093-5311	2448-2666	219							
Exon 19	5410-5484	2667-2741	75							
Exon 20	5624-5662	2742-2780	39							
Exon 21	5801-5833	2781-2813	33							
Exon 22	5931-5960	2814-2843	30							
Exon 23	6091-6123	2844-2876	33							
Exon 24	6263-6319	2877-2933	57							
Exon 25	6427-6471	2934-2978	45							
Exon 26	6561-6626	2979-3044	66							
Exon 27	6786-6860	3045-3119	75							
Exon 28	6977-7048	3120-3191	72							
Exon 29	7146-7208	3192-3254	63							
Exon 30	7328-7429	3255-3356	102							
Exon 31	7557-7669	3357-3468	112							

Tabla 2. Organización de los exones en el gen PfRON5.

El alineamiento de las secuencias de proteínas ortólogas realizado con clustalW muestra que la región C-terminal es más conservada que en la región N-terminal, y que la longitud de las secuencias es mayor en los géneros mas ancestrales (*Neosora, Theileria y Toxoplasma*) (Anexo 2). El alineamiento realizado con las secuencias de *Plasmodium*, muestra un alto grado de conservación entre especies (Fig. 25).

PfRON5 : PbRON5 : PcRON5 : PvRON5 : PkRON5 :	* MLKYTLIYIIAGYFIS MLSILYVVAFWYAS MLSIIYLVAFYYAS MLKYVLLCATLAYPV VLKYVLLCATLAYPV	20 * ISNKLFDTLLPRNVFKKPKP LQGKLHDTLVQKNIPLIKNS ANGKLHDVLVPKNIPLIKNF ESRFFENMITPKLHVGRHP ESRFFENIITPKLHFGRNP	40 * FKKNEIKKGID HKNDSNWGHSNKNTFD HKNDGKLKNDKNSFD IKKN-LKKGKENISLD IKKN-LKNGKKNISLD	60 * KDEKSIMKNVDSIDVMFB FFBKKLLNDSSSIVVMFD VYBKKMLSDSGSINVMFD KLEKNIMKNVDSINVMFDF KIEKNIMKNVDSINVMFDF	80 * 1 RVKRFVPSRTRKTHVVGCLSQSISD RMKTVVPSTMRKQEIVGGTQNSVD RMKTVVPSTMRKQEVVGGTQNTVD KDKKFVPSKSKKAHIVGGFSQNTSD KDKKFVPSKSKKAHIVGGSQNTSD	00 PGDVEKSKYE : 103 QADVEKGKYE : 107 QSDVEMGKYE : 108 PSDVERSKYE : 107 PSDVERSKYE : 107
PfRON5 : PbRON5 : PcRON5 : PvRON5 : PkRON5 :	* 120 KAVREFENIKNEMINNSS TAIREVENNNKKMIILS TAIREVENNNQMUVIA KAIRELEKMNEMIVY I KAIRELEKMNEMIVY I	* 140 KTNKCDODISSINNFKBA EKINXALKSEKDNAIDGYNEL KEINSALENEKYIALEGYNEL KITRELDOGEYKTISNFKBA KITRELDOGEYKTISNFKBA	* 160 SEVIK DSLATMESLDI SSIMK DELATMYSIDS SSIK DELATMYSLDS SALIK DSLATMESLDV SALIK DSLATMESLDM	* 180 IRNDGSVDFSKYTLDWYS KNANIINFSKYNTDWXA KNATIDFSKYDTDWYAN I NDKTVDFTKYNLEWYA KNDKTVDFNKYNLDWYN	* 200 ANMREKYSIEKS OKIMMALT KAR ASMADKYJAARY ONTIDELE OPEN ATMADKYJAACHLOATIE FE TSN ASLAEKYTEKY HRIMNAF TAG ASLAEKYTEKY HRIMNALEMKAS	* KKKN MKKKK : 211 -KK VNEKK : 214 T-KKS SEKK : 215 KKKN QKKK : 215 NKKN QKKK : 215
PfRON5 : PbRON5 : PcRON5 : PvRON5 : PkRON5 :	220 * IPANIEQLEMDLIVQKEI INENIKQLETDLLLQF INENIKQLETDLLIQF IDENIEQLENDLLMQF IDENIEQLENDLLMQF	240 TENNASKLIKLVDSANDY MDNSNVSMLLKKYDDNGDKY MDNSNASMLLKKYDNGNKY ISENINVSKLLKEHDGKSPNY (SENNNVSKLLKEHDGKSPNY	260 * MHTDVCCQLGSII MVPSYTDVCNQLGHPI LABWYTDVCNQLGHPI ISPMHSDVCCQLGSTF MAPMHSDVCCQLGSTF	280 SYMFEKAYKSSINHDISY SYVFESTYKHSVNRIDE SYVFEGTYKHSVNSLEE SFMFEKLYKSAMSHDLPF SFMFEKLFKSAINHDIPF	* 300 * SOKMLERLÄYRIONMICKGTLILLE STKYFERLTTKLTKÖVENCHILLUC STKYPERLTTKLTKÖVENCHILTPUD STCYLERLKOR HOMIHKGTLILLE STCMLERLKHRIHNMVHKGTLILLE	320 KGLDDSIYLE : 319 RYFGQSIDDE : 322 RMFQHSIDLE : 323 KGLDDAIHLE : 323 KGLDDAIHLE : 323
PfRON5 : PbRON5 : PcRON5 : PvRON5 : PkRON5 :	* 340 KSKISDIMEKKFGFNDMO KNKVSNIMNKVGFIDMO KNKVSTIMNIKVGFIDMO KLKVAELMOKKFGFVDMO KLKVAELMOKKFGFVDMO	* 360 TDKCMDEHIKADYDISEYKN SKKCFDDTIEINYK DKYDI SKKCFEDIVEEKWKIDKDI SNKCIAEIVNASYDIEEYKN STKCVADTVNANYDIEEYKN	* 33 EFSESKTAQRRADLVK HLDPQNTNQRRGDLTR VLNBQNTKQRRGDLTR EFKETNTSQRRADMVK EFKETNTSQRRADMVK	* LMYYYRDKIYN IBTSAD VLYYYKEIINRIBANADI TLYYYKDTINTBAIADI (LMYYYRDKLNNIBTTAD (LMYYYRDKLNNIBTTAD	400 * 420 VLIMLLYENSANELSEKSYLDVSSI VLIMLHESSSAKTISSGREDIDIT TLIMLHESSSAKTISGREDIDIT VLIMLLYENSATEHTEKSFIDVSSI VLIMLLYENSATEHTEKSFIDVSSI	* STDDEFNLIN : 427 QTTSKQNLIN : 430 QTSNKKNLML : 431 STSDKFNLLN : 431 STTDKFNLLN : 431
PfRON5 : PbRON5 : PcRON5 : PvRON5 : PkRON5 :	440 * KT DRSHKFNKKIKIKKK LA ENDKKSKR LAGEGDKKSKRNKR TT DKRKKVKKNKR TT DKRKKVKKNRR	<pre>4 60 * CT FF LAP NFREETOFTOFTO CT FF LAPK NFRD-PODSY NLFRLAPKFFRD-QDSY SLIAP NFREEDERVG IS LAAP NFREEDERVG</pre>	480 NESIFAIDDI <mark>KTSLL</mark> SASIFAIDDIMKTSL TASIFAIDDIMKTSL NESIFAIDDIKTCLL NESIFAIDDIKTCLL	* 500 AKKSONYNSLYETTKDLON SKKFKNYDSLYEKTKGLON SKKFKNYNYLYEKTKGLON AKKSONFSSLYETTKEVON AKKSONFSSLYETTKEVON	* 520 * WIONNYSASYGFVOSKIKTNKEVG DIONTYSASYGFVOSKIKTNKEVG DIONTYSASYGFVPSKKIKAOSFIA ISIOSTYSASYGFVASKKEKTKSFIA INIONTYSASYGFVASRKEKTKSFIA	540 SKIRNVGFLL : 535 SKIRNVGFL : 530 SKIRNVGFL : 531 SRIRNVGFV : 536 SRIRNVGFV : 536
PfRON5 : PbRON5 : PcRON5 : PvRON5 : PkRON5 :	* 5 RMENYNKTPSKNINFLYN RMENNNELESNDVNFLYR KMENYNAKASPHVNFLYP NMENYNMKASPHVNFLYP	560 \$ 5 NESPLVSISLOLVFFITMI NYSPLVSISLOLTFFISMI NYSPLASLSLOLTFFINMI NESPLISVSLOLTFFISMI NESPLISVSLOLTFFISMI	80 * EQYESSFLONFSSALKI EQYESSFLONFSSALK EQYESSFLONFSSALKI EQYESSFLSNFSSTLKI EQYESSFLSNFSSTLKI	600 * KIFTLGKSGRNPRNYNDIX KIFTLGKSGNPKNYDDI KIFTLGKSGANPKNYSDI KIFTLGASSAHPRNYADIX KIFTLGASSAHPKNYADIX	620 * 6 NFSEVDYLLRISKANVORIIMOI SFSEIDYLLRIKKAIAVORIIMOI SFSEIDYLLRIKKAIAVORIINOII SFSEIDYLLRIKKAIAVORIINOII 7-FSEIDYLLRISKAIKAORIIIOIV 75FSEIDYLLRISKIIKAORIIIOIV	40 RMLKKKFLSS : 643 KILKKKFFSG : 638 KVLKKKFFSA : 639 KMLKKKFLSL : 644 KMLKKKFLSL : 644
PfRON5 : PbRON5 : PcRON5 : PvRON5 : PkRON5 :	* 660 SYTPTLLAQYMSIFLSLW EYTPTLFAQYWSIFLSLW EFTPTLFAQYWSIFLSLW PYTPTLLAQYISIFLSLW PYTPTLLAQYISIFLSLW	* 680 VVFEGENNISLONPNISRFKK VVFEGEKDISMNNPNISRFKK VVFEGCKDISMNNPNISRFKK VVFENERNISLENPNVTRFKK VVFENEKTISLENPNVTRFKK	* 700 IFFLYFVHEKGPVEK IFFLSFLVHNSGVEK IFFLSFLVHKSGIVEK IFFLSYFVHNSGPAEK IFFLSYFVHNSGPAEK	* 720 AVDIIYNKCRMKTDKIVLG ATBIICKSCOKKTKKIVLG ATBIVCKNCCHKTKKIVLG AVBIIYDRCRGKTDKIVLG AVBIIYDRCRGKTDKIVLG	* 740 CIHDYGGREKKLLGLISRKCKPTK CIDDYGGRTKKKILGIFSRCKPTI CIDDYGGRDKTKILGLFTRKCKPTI CIHDYGGAKQKKLLGIINKQCKPTR CIHDYGGAKEKKILGIIKKKCKPTR	* ISIRKSIRK : 751 VPIH&KSVRK : 746 VPINKRSVRK : 747 IPIRKRSIRK : 752 IPIRKRSIRK : 752
PfRON5 : PbRON5 : PcRON5 : PvRON5 : PkRON5 :	760 * ILNKIMSSINDPVDILR ILZVIMTTISPELDILX ILZVIMTTITPELDILX VIXTIMSSITDPVDILX VIXTIMSSITDPVDILX	780 * AVDLT RC DHFNRSKNIDNV AVDLSTRCKYYNDSSS AADLTRCKYYNDAAPN AVDLT RCCHFSRSASMONN AVDLTRCDHFSRSAPMHCK	800 * KTKKNKINYEI FVKSE KKKHKENYDI FVKSE SKKKHKENYDI FVKSE KKKNKINYDI FVKSE KKKKNKINYDI FVKSE	820 LSIRYICADVTKNVVKKI LSIRHTCAVVTRKLVOKS LSIRHTCAVVTRKLVOKS LSFRYICADVTKKVVKKI LSFRYICADVTKKVVKKI	* 840 * RDVSRLKINNEAONIDNGDNSVQY KRVSRLKDF BAPSIIE TIDSVQY KRVSRLKDF BAPNIIE TIDSVQY RDVSRLKNM BAQELID SINSVQY RDVSRLKNM BAQEIID SINSVQY	860 LKIRNYRDKE : 859 LKMRNHRDPN : 851 LKMRNHRDPD : 852 LKIRNYRDKE : 860 LKIRNYRDKE : 860
PfRON5 : PbRON5 : PcRON5 : PvRON5 : PkRON5 :	* 880 SSFTILCPFMEGNDKNIF SGFTILCPFMQGTDKIT SFTVLCPFMQGTDKIT SSTSIFCPFMEANDKIT SSTSIFCPFMEANDKIT	* 900 ELERTOISLFIHMNIGMSRI ULERSOIISYULKNGIYNL NLERSOIISYVLKNGISNI ELERKOISIFVHKNGILN ELERKOISIFVHKNGILN	* 9: IKGKLINIFKKTLNM FKGKLHNLFSKNINIK IKGKIHNIFSKNINM LKGKVANVFKKSINIR IKGKVANVFKKSIKI	20 2GIKSDSAISKVGARKY 2GVRPDSVVTVKVGCRKF 2GIKSDSVVTKVGCRKFN 2GIKTDSPISKVGMRKFN 2GMKTDSPISKVGTRKFN	940 * 960 GIIGTGGYQLNVDLDQ-NTLHTGL IGNLSVGGYNLNMDIDQ-NTLHTGL GSISVGGYNLNMDIDQN-ALHIGL IGSISVGGYNLNMDSFEQENTLHIGL IGFLSTGGYQLNMDSFEQENTLHIGL	* SKTRKVYDGR : 966 SKSRKVYDGS : 959 SKSRKVYDGR : 968 SKSRKVYDGR : 968
PfRON5 : PbRON5 : PcRON5 : PvRON5 : PkRON5 :	980 * KYVDELIIKGDGVKNI KYVDELIIKRDGIKDI CYVDELIIKRDGIKDI QYVDELIIKRDGVKRI QYVDELIIKPDGVKRI	* 1000 * % KGLNE DNERIY TSTGKEI LKGI DNDNERLY TSTGKEI MKGI DE DNERLY VI SNGEI MKGI DE DNERFY VI QDKT «V MKGI DE DNERIY VI QDNT «V	1020 SEF DYALQNEDANIIV SEF DYAKENPMANIII SEFEYAKENPMANIII PEFEYALLYPSADIII PEFEYALLYPSADIII	* 1040 FDGNNYISSYALRNMGLEF FDGNNYISSYALRKIGLEN FDGNNYISSYALREIGLEF FDGNNYVSSSALRDMGLEY FDGNNYVSSSALRDMGLEY	* 1060 ** ERIVWAGPSVGWTAEFALSAISDRP DERIVWAGNSVGWAAEFALONISDRP ERIVWAGNNVGWAAEFALONISDRP ERIVWAGNTVGWVAEFALCTISENP ERIVWAGHAVGWAAEFALCTISENP	1080 IPIFDGSAMV : 1074 IPIFDGSAMI : 1066 IPIFDGSAMI : 1067 IPIFDGHAWV : 1076 IPIFDGHAWV : 1076
PfRON5 : PbRON5 : PcRON5 : PvRON5 : PkRON5 :	* 11 LLEKLSIRSILGKHLES LLIKLSIRNILGN LERN LLIKLSIKNILGN LERN LLIKLSVKSILGE LERI LLIKLSVKSILGE LERI	* 11 VNGNSLANTVNFVILNKDGK VNGNILAKDINFTILNKDGK VNGNILAKDINFTILNKDGK VRGSLLASTVNFILLNKEGR	20 * PILKNTTPVINLKYAT AILKNTMPIVNLKNAT AILKNTMPIVNLKNAT QILKNTTPVVSLKHAT QLLKNTTPVVSLKHAT	1140 * FTLSGIVNFVIKAEKGIGN TTLNGIINEVIKAEKGNDN FTLSGUNFVIKAEKGNDN FTLSGIINEVIRAEKGKGN	1160 JEIIVITRIP : 1156 JEIIVITRIP : 1148 JEIIVITRIP : 1149 JEIIVITRIP : 1158 JEIIVITRIP : 1158	

Figura 25. Alineamiento de las secuencias de las proteínas RON5 en diferentes especies de *Plasmodium*. El sombreado indica el porcentaje de identidad. Las letras blancas sobre un fondo negro representa los residuos con 100% de identidad; las letras blancas sobre un fondo gris representan los residuos con 80% de identidad; y las letras negras sobre un fondo gris representan los residuos con el 60% de identidad. Pf, *Plasmodium falciparum*; Pb, *Plasmodium berghei*; Pc, *Plasmodium chabaudi*; Pv, *Plasmodium vivax*; Pk, *Plasmodium knowlesi*.

Se realizó otro alineamiento comparando las secuencias de las diferentes proteínas del cuello de las roptrias identificadas en *Plasmodium falciparum* (PfRON2, PfRON4, PfRON3, PfRON5 y PfRON6) (Anexo 3), y no se observó similitud entre ellas, lo cual indica que estas proteínas no pertenecen a una familia génica, y el hecho de que todas sean denominadas RONs se relaciona únicamente por la localización compartida entre ellas.

La búsqueda del porcentaje de identidad (I) y similitud (S) entre cada proteína ortóloga con la PfRON5 mostró los siguientes valores en orden descendente: *P. vivax* (I 68.7% y S 84.8%), *P. knowlesi* (I 68,3% y S 84,3%), *P. chabaudi* (I 57,4% y S 76,1%), *P. berghei* (I 57% y S 75,7%), *P. yoelii* (I 32,9% y S 42,7%), *B. Bovis* (I 18,6% y S 33,8%), *Theileria annulata* (I 17,1% y S 31,7%), *Theileria parva* (I 14,7% t S 27,3%), *Neospora caninum* (I 15,8% y S 29%) y *Toxoplasma gondii* (I 14,1% y S 26,5%).

A partir de las secuencias ortólogas encontradas, se construyeron árboles filogenéticos con los métodos Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987), Máxima parsimonia (Nakhleh L, 2005) y Mínima evolución (Cavalli-Sforza LL, 1967) incluidos en el software Mega 4.0 (Tamura et al., 2007). Los árboles construidos por los tres métodos muestran una topología similar, tanto con pairwise deletion como con complete deletion (anexo 4). La mayoría de los nodos de los árboles fueron soportados por valores significativos de Bootstrap (>70%) (Hillis and Bull, 1993), sin embargo, se escogió el árbol con mayor valor de Bootstrap para todas las ramas (Fig. 26). El árbol muestra tres clados dentro de los cuales se observa que el género *Plasmodium* es parafilético respecto a los géneros *Babesia* y *Theileria*. Dentro de la agrupación de especies de *Plasmodium* se observan dos ramas, una contiene las especies que infectan primates (*P. vivax*, *P. knowlesi* y *P. falciparum*) y la otra contiene las especies que infectan roedores (*P. yoelii*, *P. chabaudi* y *P. berghei*). También se puede observar que la proteína RON5 se ha mantenido a través de los géneros pertenecientes al filo *Apicomplexa*.



Figura 26. Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de PfRON5 y ortólogos. Árbol filogenético construido por el método de Mínima evolución y teniendo en cuenta los gaps presentes en el alineamiento (pairwise deletion). Se utilizaron1000 réplicas de Bootstrap. La escala indica 0.2 sustituciones por sitio.

El péptido señal se predijo con la herramienta InterProScan (aa 1–21) (Quevillon et al., 2005), indicando que esta proteína cuenta con una secuencia aminoácidos hidrofóbicos en el extremo N-terminal que permite la translocación a la membrana del retículo endoplasmático y su posterior transporte por el aparato de golgi.

La búsqueda de dominios transmembranales (TMs) con diferentes herramientas bioinformáticas, muestra diferencias en cuanto al número y posición de los TMs predichos (Tabla 3). Sin embargo, se estableció un consenso teniendo en cuenta que los dominios encontrados con Polyphobius se repiten en otros predictores, es decir, para el dominio que comprende la región de los aminoácidos 554 y 573 (resaltado en azul en la tabla), fue encontrado también por TMpred (aa 555-573) y ConpredII (aa 554-574) y el dominio que va de los aminoácidos 642 y 663 (resaltado en rojo en la tabla), fue encontrado también por Phobius (aa 640-663) y TMpred (aa 645-663) (Tabla 3).

Tabla 3. Regiones transmembranales predichas utilizando diferentes predictores.

Herramienta bioinformática	Número de regiones TMs	Posición	Referencia				
TMHMM2.0	ninguno		(Krogh et al., 2001)				
Dhahing	2	6-24	$(K_{all} \text{ at al} 2004)$				
Filodius	2	640-663*	(Kall et al., 2004)				
		1-19					
		250-270					
TMpred	5	383-403	(Hofmann K and Stoffel 1993)				
		555-573*	5101101, 1995)				
		645-663*					
ConpredII	1	554-574*	(Arai et al., 2004)				
Dalumhahing	2	554-573*	$(K_{\rm oll} \text{ at al} 2005)$				
Polyphobius	2	642-663*	(Kall et al., 2005)				

*Los colores azul y rojo muestran las regiones TMs predichas por diferentes herramientas.

8.4. Obtención de anticuerpos anti-PfRON5

8.4.1. Péptidos a inocular

Los secuencias seleccionadas para la síntesis de acuerdo a los criterios mencionados en la sección de materiales y métodos (numeral 6.2.4.1.) fueron las siguientes: CG-33-FKKPKPFKKNEIKKGIDKDE-52-GC (péptido 36924), CG-348-ADYDLSEYKNEFSPSKTAQR-367-GC (péptido 36923) y CG-776- RCDHFNRSKNIDNVKTKKNK-795-GC (péptido 36926). En la figura 27, se puede observar la distribución de los tres péptidos en la secuencia de la proteína.



Figura 27. Representación esquemática de la proteína PfRON5 y los péptidos inoculados. Se muestra la distribución de los tres péptidos inoculados a lo largo de la proteína. PS: péptido señal

8.4.2. Reconocimiento de los péptidos inoculados.

Se realizó un ensayo de ELISA para determinar si los péptidos inoculados inducen la producción de anticuerpos. En la figura 28, se puede observar la ausencia de reconocimiento por parte de los sueros pre-inmunes, y el alto reconocimiento (Absorbancia >1) por parte de los sueros 69 y 73 hacia los péptidos inoculados.



Figura 28. Reconocimiento de los sueros hacia los péptidos inoculados. Se observan valores altos de absorbancia en los sueros HI (Hiper-Inmune) de los sueros 69 y 73. Se observa una señal mínima para los sueros PI (Pre-Inmune).

8.5. Análisis de la expresión de la proteína PfRON5.

8.5.1. Detección de la proteína PfRON5 en los lisados de P. falciparum.

En la figura 29, se observa que el suero policional 73 reconoce una proteína de ~110 kDa en los lisados parasitarios de estadíos del ciclo eritrocítico relacionados con la invasión a la célula huésped: esquizontes y merozoitos libres. El peso de la banda observada concuerda con el peso molecular predicho en PlasmoDB (133,7 kDa) y con los reportado anteriormente (Richard et al., 2010). Se puede observar además, la ausencia de reconocimiento en todos los sueros pre-inmunes. Se obtuvieron resultados similares con el suero 69 (datos no presentados).

Para determinar la especificidad del reconocimiento péptido-anticuerpo, se realizó un western blot con los sueros hiper-inmunes previamente incubados con los péptidos anti-PfRON5. Se observó que se pierde el reconocimiento en los lisados de esquizontes y merozoitos, esto confirma que las bandas obtenidas corresponden a la proteína PfRON5 (Fig. 29).



Figura 29. Tiempo de expresión de la proteína PfRON5. Western blot realizado con lisados de parásito en diferentes tiempos: anillos (4–8 h), trofozoitos jóvenes (19–24 h), trofozoitos maduros (26–31 h), esquizontes (42–47) y merozoitos libres (Mz). Se observa que PfRON5 se expresa únicamente en esquizontes y merozoitos libres, y cuando se incuban los sueros con los péptidos de PfRON5, el reconocimiento se pierde. PI, sueros Pre-inmune; HI, suero Hiper-inmune; I, sueros hiper-inmune incubados con los péptidos anti-PfRON5.

8.5.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Seguido a la detección de la proteína PfRON5 por western blot, se procedió a determinar la localización subcelular de esta proteína. La Figura 30 muestra un patrón punteado en la inmunofluorescencia, lo cual coincide con lo reportado para las proteínas de las roptrias (Topolska et al., 2004). Gracias a la coloración con DAPI, se descarta que el patrón obtenido signifique un reconocimiento nuclear.



Figura 30. Localización de la proteína PfRON5 por IFI. Las flechas muestran un patrón punteado en el suero Hiper-Inmune (HI). Se observa la ausencia de fluorescencia en el suero Pre-Inmune (PI).

8.5.3. Microscopía Inmunoelectrónica

A pesar de que el patrón observado en la inmunofluorescencia fue característico de roptrias, se realizó una microscopía electrónica con el fin de ser más específicos con la localización de la proteína PfRON5. La Figura 31 muestra las partículas de oro coloidal localizadas específicamente en el cuello de las roptrias, y su ausencia en demás organelos celulares del merozoito, similar a lo reportado para otras proteínas del cuello de las roptrias como PfRON4 (Alexander et al., 2006) y PfRON2 (Cao et al., 2009).



Figura 31. La proteína PfRON5 se localiza en el cuello de las roptrias. Los anticuerpos de conejo dirigidos contra los péptidos poliméricos de PfRON5 confirman la localización de esta proteína en el cuello de las roptrias.

9. DISCUSIÓN

En los años 70 Aikawa y colaboradores describieron la formación de una unión fuerte entre las membranas del eritrocito y el merozoito como proceso fundamental para llevar a cabo el proceso de invasión. Teniendo en cuenta que esta unión es móvil y permite la entrada del merozoito al glóbulo rojo, a esta unión se le conoce con el nombre de Tight o Moving Junction (Aikawa et al., 1978).

Han transcurrido aproximadamente 40 años a partir de la descripción mediante microscopía electrónica del Tight Junction, sin embargo, el estudio de las proteínas asociadas al Tight Junction en realidad lleva poco tiempo. El punto de partida para la identificación de las proteínas del cuello de las roptrias inició con el estudio del proteoma de las roptrias en *Toxoplasma*. Bradley y colaboradores, identificaron un gran número de proteínas roptrias; dentro de las que cuatro se encontraban específicamente localizadas en el cuello de las roptrias (RON1, RON2, RON3 y RON4) y una proteína denominada Twin-Scan_4705 (Bradley et al., 2005). Gracias a los trabajos de Lebrun y colaboradores y de Alexander y colaboradores se encontró una asociación entre las proteínas RON4, RON2 y la proteína Twin-Scan_4705 (Alexander et al., 2005; Lebrun et al., 2005). Posteriormente, Straub y colaboradores llamarían a esta proteína RON5 (Straub et al., 2009).

Con base en la información reportada acerca de la proteína RON5 en *Toxoplasma gondii* (Straub et al., 2009), y los estudios en *P. falciparum* que muestran su posible rol en la invasión (Collins et al., 2009; Treeck et al., 2009; Richard et al., 2010), en este trabajo se propuso la identificación de la proteína RON5 en la cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum*. Esta cepa fue aislada de un paciente Colombiano proveniente de San Martín-Meta y fue adaptada en Bogotá, como indican sus siglas: F (*P. falciparum*), C (Colombia-país de origen), B (Bogotá-sitio de adaptación) y 2 (segundo aislado) (Espinal et al., 1982).

La amplificación de un fragmento del gen Mal8p1.73 que codifica para la proteína PfRON5, confirma su presencia en el ADN genómico del parásito de la cepa FCB2 (Fig. 20). Y la amplificación del ADNc obteniendo una banda esperada de ~3468 pb confirma que este gen se está transcribiendo (Fig. 21). Mediante la secuenciación se evidencia que el transcrito de PfRON5 corresponde a la secuencia Mal8p1.73 reportada en PlasmoDB.

Cuando se compara la secuencia obtenida de la cepa FCB-2 con la secuencia de referencia 3D7, se encuentran solo tres sustituciones aminoacídicas, y la comparación de las cepas Pas-2 y FCB-2 muestra solamente una sustitución no sinónima. Estos resultados indican un polimorfismo genético

muy limitado de esta proteína entre las cepas comparadas, similar a lo reportado para otras proteínas de roptrias, como PfRAP-1 (Howard and Peterson, 1996), PfRAP-2 (Saul et al., 1992) y PfRON2 (Cao et al., 2009). La conservación en la secuencia de la proteína PfRON5, tiene especial importancia si se tiene en cuenta que el polimorfismo genético es utilizado por el parásito como un mecanismo para evadir la respuesta inmune (Kyes et al., 2001). De manera que, el uso de proteínas conservadas e importantes en el proceso de invasión en el desarrollo de métodos de control, puede tener gran significancia en el desarrollo de una vacuna efectiva (Hisaeda et al., 2005; Casares and Richie, 2009).

Sin embargo, estudios adicionales con muestras de pacientes provenientes de diversas áreas geográficas y con otras cepas de *Plasmodium*, similares a los realizados para otras proteínas como Stevor, MSA-1 y RAMA (Raj et al., 2004; Kar et al., 2007; Blythe et al., 2009), son necesarios para confirmar el hecho de que PfRON5 es una proteína conservada.

La presencia de la proteína PfRON5 en diferentes géneros del filo *Apicomplexa* evidenciado por los resultados de BLAST y los análisis filogenéticos, muestran que la proteína PfRON5 se ha mantenido a lo largo de la evolución de los parásitos pertenecientes a este filo. Esto sugiriere que esta proteína tiene un rol biológico muy importante.

La filogenia de *Plasmodium* aún es controversial, y cuando se construyen árboles filogenéticos utilizando genes diferentes no siempre son consistentes entre sí (Nishimoto et al., 2008). Sin embargo, la filogenia obtenida en este trabajo con la secuencia de la proteína PfRON5 es similar a la descrita por otros autores, donde las especies *P. chabaudi*, *P. berghei* y *P. yoelii* son monofiléticos respecto a las especies *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. knowlesi* (Fig. 26 y 32). Esto tiene gran importancia si se tiene en cuenta que además la topología del árbol obtenido es similar y tiene en algunos nodos con mayores valores de bootstrap a la obtenida con marcadores ya establecidos como la sub-unidad pequeña 18S de rRNA(18S SSU rRNA) (Anexo 5). Todo esto lleva a sugerir que esta proteína podría servir como marcador para la reconstrucción filogenética de las especies de *Plasmodium* y géneros del filo *Apicomplexa* (Anexo 5).



Figura 32. Árbol filogenético del género *Plasmodium*. Árbol inferido a partir de genomas mitocondriales parciales (5580 pb). Los números sobre las ramas representan las probabilidades en términos de porcentajes, y la barra de escala representa el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. En este caso se utilizó el hemosporidio de las aves, *Leucocytozoon sabrazesi* como out-group. Tomado de: (Carlton et al., 2008)

El estudio *in silico* llevado a cabo con la secuencia de la proteína PfRON5, sugiere la presencia del péptido señal y varios dominios transmembranales, sin embargo no hay predicción de posibles dominios funcionales.

Richard y colaboradores, utilizando la secuencia hipotética de PfRON5 de la cepa 3D7 y mediante un perfil de hidrofobicidad, sugieren que la proteína PfRON5 tiene 6 TMs (Richard et al., 2010). Sin embargo, estos perfiles, como por ejemplo el plot de Kyte and Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982), solo identifican los posibles segmentos transmembranales, sin predecir que región se encuentra intrao extracelular (Jones, 2007). Por esta razón se decidió utilizar varias herramientas bioinformáticas con el fin de construir una posible topología de esta proteína, encontrándose diferencias entre el número y posición de los TMs.

Esta discrepancia es posiblemente debida a los diferentes enfoques de cada predictor utilizado: 1) TMpred, se basa en un análisis estadístico de los datos consultados (query) en relación con la base de datos TMbase, que otorga puntaje usando una combinación de matrices de peso (Hofmann K and Stoffel, 1993); 2) TMHMM2.0, Phobius y Polyphobius usan aprendizaje de máquinas, principalmente modelos ocultos de Markov. La diferencia entre ellos radica en que Phobius y Poliphobius usan además redes neuronales artificiales para predecir la presencia de péptido señal, y que Polyphobius se basa también en la predicción por homología ya que calcula las probabilidades teniendo en cuenta alineamientos de secuencias homólogas (Krogh et al., 2001; Kall et al., 2004; Kall et al., 2005; Jones,

2007); 3) ConpredII realiza un consenso basado en el promedio de los resultados de varios predictores (KKD, TMpred, TopPred II, DAS, TMAP, MEMSAT 1.8, SOSUI, TMHMM 2.0 and HMMTOP 2.0) (Arai et al., 2004).

Otra razón importante, y posiblemente responsable de la discrepancia en estos resultados, es la existencia de una escasa representación de las secuencias de protozoos respecto a las demás secuencias eucariotas en los sets de entrenamiento de los predictores, lo cual dificulta la predicción de TMs en estos organismos.

La discrepancia entre los TMs predichos, también ha sido reportada para otras proteínas del cuello de las roptrias, por ejemplo, inicialmente para TgRON2 se reportaron 3 TMs, y posteriormente se demostró que el tercer dominio (residuos 1346-1348) no correspondía a un TM ya que esta región se encuentra en el medio extracelular durante la invasión en el TJ (Tyler and Boothroyd, 2011).

Teniendo en cuenta las siguientes tres consideraciones: 1) Polyphobius tiene en cuenta la homología con otras secuencias para la predicción de TMs, 2) para PfRON5 los TMs predichos con Polyphobius son conservados en otros géneros y especies, a excepción de *Toxoplasma* y *Neospora*, en la cuales no se predijo TMs (Anexo 6) y 3) la predicción de estructura secundaria con predictores como SOPMA (Geourjon and Deleage, 1995), muestra que esta proteína está conformada principalmente por hélices alfa (Fig. 33) incluyendo, las regiones predichas como TMs (Anexo 7); se sugiere que los residuos 554 al 573 y los residuos 642 al 663 corresponden a los TMs de la proteína PfRON5. De tal manera que los residuos del 20 al 553 y 664 al 1156 se encuentran en el medio extracelular y los residuos 574 al 641 en el citoplasma de la célula huésped (Fig. 34).



Figura 33. Predicción de la estructura secundaria de la proteína PfRON5. La predicción realizada con SOPMA muestra que en su mayoría, la proteína está compuesta por hélices alfa (azul). También presenta estructura de hojas β (rojo) y β -turn (verde).



Figura 34. Topología hipotética para la proteína PfRON5. En este modelo, la proteína PfRON5 tiene 2 dominios transmembranales, de esta manera, gran parte de la proteína queda expuesta hacia el medio extracelular.

Los anticuerpos anti-péptidos de la proteína PfRON5 reconocen una proteína con una masa molecular de ~110 kDa en los lisados de esquizontes y merozoitos libres, este reconocimiento se pierde al incubar el suero con los péptidos inoculados antes de realizar el western blot. Esto indica, que la banda encontrada corresponde al reconocimiento de la proteína PfRON5 y que la expresión de esta proteína se está llevando a cabo en estadios relacionados con la invasión a la célula huésped, sugiriendo una posible función en este proceso (Fig. 29). La expresión específica en esquizontes y merozoitos está de acuerdo con la transcripción del gen evaluada mediante microarreglos en la cepa 3D7 (Bozdech et al., 2003b; Le Roch et al., 2003). En la tabla 4 se observa que los valores más altos de E (expresión) se encuentran en el estadio de esquizonte y merozoito.

	Sorb	oitol	Temperatura				
	Ε	LogP	Ε	LogP			
Anillo joven	9	-0,6	21,7	-0,6			
Anillo maduro	22,4	-0,3	36,8	-0,7			
Trofozoito joven	41	-1,3	15	-0,2			
Trofozoito maduro	45,6	-1	42,7	-0,6			
Esquizonte joven	374,5	-4	163,7	-2			
Esquizonte maduro	362,2	-4,1	692,6	-7			
Merozoito	10,5	-0,3	176,6	-2,8			

Tabla 4. Nivel de expresión (E) de PfRON5 en diferentes estadíos del ciclo eritrocítico.

Tabla 4. Datos obtenidos por microarreglos. Para determinar la presencia del transcrito: E>10 y LogP<-0,5. Datos tomados de: (Le Roch et al., 2003).

Straub y colaboradores muestran que la proteína TgRON5 sufre un procesamiento proteolítico en dos fragmentos denominados N y C-terminal de ~110 y ~45 kDa, respectivamente y sugieren que este

procesamiento se debe a que la secuencia tiene dos sitios de procesamiento tipo ROP1 (SFVE[^]) para la proteinasa TgSUB2 (Subtilisina tipo serin proteasa) en los residuos 311 al 314 y 1259 al 1262 (Straub et al., 2009). En este trabajo, no se encontraron indicios del procesamiento proteolítico de PfRON5 y la secuencia SFVE no se encontró al buscarla en la secuencia de la proteína PfRON5.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta, tomando como antígeno glóbulos rojos infectados con esquizontes de la cepa FCB-2 de *P. falciparum*, los resultados muestran un patrón punteado característico de las proteínas de las roptrias (Topolska et al., 2004) (Fig. 30). Además, se llevaron a cabo ensayos de microscopía inmunoelectrónica donde se observan perlas de oro coloidal en el cuello de las roptrias, con su característica forma de pera, llevando a cabo la confirmación de la localización de la proteína PfRON5 (Fig. 31).

Tomando en cuenta la asociación con de PfRON5 con PfAMA1 y otras proteínas RON en la formación del complejo del Tight Junction, su expresión durante los estadíos relacionados con la invasión a los glóbulos rojos y su alto grado de conservación de la secuencia, hacen de esta proteína un blanco atractivo para ser incluido en futuros estudios destinados a evaluar su potencial como candidata a vacuna.

10. CONCLUSIONES

- El gen que codifica para la proteína PfRON5, está presente y se expresa en la cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum*.
- Las secuencia de ADN codificante de la cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum* es muy conservada respecto a la secuencia reportada en la base de datos de PlasmoDB (3D7) y a la cepa Pas-2.
- La proteína PfRON5 tiene un péptido señal (aa 1 al 20) y 2 dominios transmembranales (aa 554 al 573 y aa 642 al 663).
- La proteína PfRON5 se expresa en esquizontes y merozoitos libres, estadios relacionados con el proceso de invasión.
- La inmunofluorescencia sugiere que PfRON5 se encuentra localizada en las roptrias, lo cual es confirmado mediante microscopía inmunoelectrónica donde se observa específicamente su localización en el cuello de las roptrias.

Nota:

Los resultados de este trabajo fueron publicados en la revista Gene de Elservier. El artículo se encuentra anexo al final del escrito.

11. PERSPECTIVAS

La Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) ha trabajado por más de tres décadas en el descubrimiento de una metodología lógica y racional para el desarrollo de vacunas (Patarroyo et al., 2004; Cifuentes et al., 2008; Patarroyo and Patarroyo, 2008; Patarroyo et al., 2011). Siguiendo este enfoque, se sugiere llevar a cabo los siguientes ensayos:

- Realizar ensayos de unión al glóbulo rojo con el fin de identificar los péptidos de alta capacidad de unión (HABPs, por sus siglas en inglés) a la célula huésped.
- Diseño de péptidos análogos derivados de los péptidos HABPs y ensayos de unión con estos péptidos para encontrar exactamente los residuos críticos importantes en la interacción con la célula huésped.
- Modificación de los residuos críticos buscando un ajuste adecuado en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- Someter con un reto experimental a monos del género *Aotus* previamente inoculados con péptidos modificados con el fin de confirmar o no la posibilidad de que PfRON5 sea un antígeno importante en el desarrollo de una vacuna contra la malaria causada contra *P*. *falciparum*.

Se sugiere además:

- 1. Ensayos que permitan estudiar la interacción entre las proteínas miembros del complejo TJ mediante técnicas de interacción proteína-proteína como *pull down*.
- 2. Realizar la identificación de las proteínas RON en otras especies de *Plasmodium* de gran importancia epidemiológica, como el caso de *P. vivax*.

12. BIBLIOGRAFIA

- Aikawa, M., Miller, L.H., Johnson, J. and Rabbege, J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol* **77** (1978), pp. 72-82.
- Alexander, D.L., Arastu-Kapur, S., Dubremetz, J.F. and Boothroyd, J.C. Plasmodium falciparum AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in Toxoplasma gondii. *Eukaryot Cell* 5 (2006), pp. 1169-73.
- Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P. and Boothroyd, J.C. Identification of the moving junction complex of Toxoplasma gondii: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog* 1 (2005), p. e17.
- Anantharaman, V., Iyer, L.M., Balaji, S. and Aravind, L. Adhesion molecules and other secreted hostinteraction determinants in Apicomplexa: insights from comparative genomics. *Int Rev Cytol* 262 (2007), pp. 1-74.
- Arai, M., Mitsuke, H., Ikeda, M., Xia, J.X., Kikuchi, T., Satake, M. and Shimizu, T. ConPred II: a consensus prediction method for obtaining transmembrane topology models with high reliability. *Nucleic Acids Res* 32 (2004), pp. W390-3.
- Baer, K., Klotz, C., Kappe, S.H., Schnieder, T. and Frevert, U. Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog* **3** (2007), p. e171.
- Bahl, A., Brunk, B., Crabtree, J., Fraunholz, M.J., Gajria, B., Grant, G.R., Ginsburg, H., Gupta, D., Kissinger, J.C., Labo, P., Li, L., Mailman, M.D., Milgram, A.J., Pearson, D.S., Roos, D.S., Schug, J., Stoeckert, C.J., Jr. and Whetzel, P. PlasmoDB: the Plasmodium genome resource. A database integrating experimental and computational data. *Nucleic Acids Res* **31** (2003), pp. 212-5.
- Bannister, L.H., Butcher, G.A., Dennis, E.D. and Mitchell, G.H. Structure and invasive behaviour of Plasmodium knowlesi merozoites in vitro. *Parasitology* **71** (1975), pp. 483-91.
- Bannister, L.H., Hopkins, J.M., Fowler, R.E., Krishna, S. and Mitchell, G.H. A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *Parasitol Today* 16 (2000), pp. 427-33.
- Baum, J., Gilberger, T.W., Frischknecht, F. and Meissner, M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from Plasmodium and Toxoplasma. *Trends Parasitol* 24 (2008), pp. 557-63.
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J.F. and Lebrun, M. Export of a Toxoplasma gondii rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. *PLoS Pathog* **5** (2009), p. e1000309.
- Blackman, M.J. and Bannister, L.H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol* **117** (2001), pp. 11-25.
- Blythe, J.E., Niang, M., Marsh, K., Holder, A.A., Langhorne, J. and Preiser, P.R. Characterization of the repertoire diversity of the Plasmodium falciparum stevor multigene family in laboratory and field isolates. *Malar J* 8 (2009), p. 140.
- Boothroyd, J.C. and Dubremetz, J.F. Kiss and spit: the dual roles of Toxoplasma rhoptries. *Nat Rev Microbiol* **6** (2008), pp. 79-88.
- Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B.L., Wong, E.D., Zhu, J. and DeRisi, J.L. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum. *PLoS Biol* **1** (2003a), p. E5.
- Bozdech, Z., Zhu, J., Joachimiak, M.P., Cohen, F.E., Pulliam, B. and DeRisi, J.L. Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of Plasmodium falciparum with a long-oligonucleotide microarray. *Genome Biol* **4** (2003b), p. R9.
- Bradley, P.J., Ward, C., Cheng, S.J., Alexander, D.L., Coller, S., Coombs, G.H., Dunn, J.D., Ferguson, D.J., Sanderson, S.J., Wastling, J.M. and Boothroyd, J.C. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in Toxoplasma gondii. J Biol Chem 280 (2005), pp. 34245-58.
- Cao, J., Kaneko, O., Thongkukiatkul, A., Tachibana, M., Otsuki, H., Gao, Q., Tsuboi, T. and Torii, M. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in Plasmodium falciparum merozoites. *Parasitol Int* 58 (2009), pp. 29-35.

- Carlton, J.M., Escalante, A.A., Neafsey, D. and Volkman, S.K. Comparative evolutionary genomics of human malaria parasites. *Trends Parasitol* **24** (2008), pp. 545-50.
- Carvalho, L.J., Daniel-Ribeiro, C.T. and Goto, H. Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol* **56** (2002), pp. 327-43.
- Casares, S. and Richie, T.L. Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. *Curr Opin Immunol* **21** (2009), pp. 321-30.
- Cavalli-Sforza LL, E.A. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet* **19** (1967), pp. 233-58.
- Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15** (1993), pp. 532-4, 536-7.
- Cifuentes, G., Bermudez, A., Rodriguez, R., Patarroyo, M.A. and Patarroyo, M.E. Shifting the polarity of some critical residues in malarial peptides' binding to host cells is a key factor in breaking conserved antigens' code of silence. *Med Chem* **4** (2008), pp. 278-92.
- Collins, C.R., Withers-Martinez, C., Bentley, G.A., Batchelor, A.H., Thomas, A.W. and Blackman, M.J. Fine mapping of an epitope recognized by an invasion-inhibitory monoclonal antibody on the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *J Biol Chem* **282** (2007), pp. 7431-41.
- Collins, C.R., Withers-Martinez, C., Hackett, F. and Blackman, M.J. An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. *PLoS Pathog* **5** (2009), p. e1000273.
- Cowman, A.F., Baldi, D.L., Duraisingh, M., Healer, J., Mills, K.E., O'Donnell, R.A., Thompson, J., Triglia, T., Wickham, M.E. and Crabb, B.S. Functional analysis of Plasmodium falciparum merozoite antigens: implications for erythrocyte invasion and vaccine development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357 (2002), pp. 25-33.
- Cowman, A.F. and Crabb, B.S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124** (2006), pp. 755-66.
- Deleage, G., Combet, C., Blanchet, C. and Geourjon, C. ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comput Biol Med* **31** (2001), pp. 259-67.
- Espinal, C.T., Moreno, E., Guerra, P. and De La Vega, P. Aislamiento y caracterización de cepas Colombianas de Plasmodium falciparum. *Biomédica* 2 (1982), pp. 118-128.
- Foth, B.J., Zhang, N., Chaal, B.K., Sze, S.K., Preiser, P.R. and Bozdech, Z. Quantitative time-course profiling of parasite and host cell proteins in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol Cell Proteomics* (2011).
- Garcia, L.S. Malaria. *Clin Lab Med* **30** (2010), pp. 93-129.
- 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., 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. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature* 419 (2002), pp. 498-511.
- Geourjon, C. and Deleage, G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci* 11 (1995), pp. 681-4.
- Good, M.F. Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads? *Nat Rev Immunol* **1** (2001), pp. 117-25.
- Greenwood, B. and Mutabingwa, T. Malaria in 2002. Nature 415 (2002), pp. 670-2.
- Greenwood, B.M., Bojang, K., Whitty, C.J. and Targett, G.A. Malaria. Lancet 365 (2005), pp. 1487-98
- Greenwood, B.M., Fidock, D.A., Kyle, D.E., Kappe, S.H., Alonso, P.L., Collins, F.H. and Duffy, P.E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest* **118** (2008), pp. 1266-76.

- Hehl, A.B., Lekutis, C., Grigg, M.E., Bradley, P.J., Dubremetz, J.F., Ortega-Barria, E. and Boothroyd, J.C. Toxoplasma gondii homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. *Infect Immun* 68 (2000), pp. 7078-86.
- Hillis, D.M. and Bull, J.J. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology* **42** (1993), pp. 182-192.
- Hisaeda, H., Yasutomo, K. and Himeno, K. Malaria: immune evasion by parasites. *Int J Biochem Cell Biol* **37** (2005), pp. 700-6.
- Hofmann K and Stoffel, W. TMbase a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **374** (1993), p. 166.
- Houghten, R.A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** (1985), pp. 5131-5.
- Howard, R.F. and Peterson, C. Limited RAP-1 sequence diversity in field isolates of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **77** (1996), pp. 95-8.
- INS, G.E.-. Boleti'n vigilancia de la malaria en Colombia. Boleti'n: diciembre 17 de 2010 (2010).
- Invitrogen pEXP5-NT/TOPO® and pEXP5- CT/TOPO® TA Expression Kits. User Manual (2005-2006).
- Ito, D., Han, E.T., Takeo, S., Thongkukiatkul, A., Otsuki, H., Torii, M. and Tsuboi, T. Plasmodial ortholog of Toxoplasma gondii rhoptry neck protein 3 is localized to the rhoptry body. *Parasitol Int* 60 (2011), pp. 132-8.
- Jones, D.T. Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics* 23 (2007), pp. 538-44.
- Kall, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E.L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* **338** (2004), pp. 1027-36.
- Kall, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E.L. An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information. *Bioinformatics* **21 Suppl 1** (2005), pp. i251-7.
- Kaneko, O. Erythrocyte invasion: vocabulary and grammar of the Plasmodium rhoptry. *Parasitol Int* **56** (2007), pp. 255-62.
- Kar, P., Dash, A.P. and Supakar, P.C. Polymorphism study of rhoptry associated membrane antigen (RAMA) gene of Plasmodium falciparum--a putative vaccine candidate. *Mol Biochem Parasitol* 155 (2007), pp. 156-60.
- Kats, L.M., Black, C.G., Proellocks, N.I. and Coppel, R.L. Plasmodium rhoptries: how things went pear-shaped. *Trends Parasitol* 22 (2006), pp. 269-76.
- Kim, K. and Weiss, L.M. Toxoplasma gondii: the model apicomplexan. *Int J Parasitol* **34** (2004), pp. 423-32.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol 305 (2001), pp. 567-80.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 157 (1982), pp. 105-32.
- Ladda, R., Aikawa, M. and Sprinz, H. Penetration of erythrocytes by merozoites of mammalian and avian malarial parasites. *J Parasitol* **55** (1969), pp. 633-44.
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J.F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B.W., Kocken, C.H., Thomas, A.W., Boulanger, M.J., Bentley, G.A. and Lebrun, M. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog* 7 (2011), p. e1001276.
- Larsen, J.E., Lund, O. and Nielsen, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Res 2 (2006), p. 2.
- Le Roch, K.G., Zhou, Y., Blair, P.L., Grainger, M., Moch, J.K., Haynes, J.D., De La Vega, P., Holder, A.A., Batalov, S., Carucci, D.J. and Winzeler, E.A. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* **301** (2003), pp. 1503-8.

- Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P.J., Vial, H. and Dubremetz, J.F. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during Toxoplasma gondii invasion. *Cell Microbiol* **7** (2005), pp. 1823-33.
- Lioy, E., Suarez, J., Guzman, F., Siegrist, S., Pluschke, G. and Patarroyo, M.E. Synthesis, Biological, and Immunological Properties of Cyclic Peptides from Plasmodium Falciparum Merozoite Surface Protein-1 This work was supported by a long-term fellowship of the Human Frontier Science Program Organization (HFSPO-LT 25/97) and by a Research Grant from the Roche Research Foundation. *Angew Chem Int Ed Engl* **40** (2001), pp. 2631-2635.
- Markus, M.B. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitol Res* **108** (2011), pp. 247-52.
- Matuschewski, K. Vaccine development against malaria. Curr Opin Immunol 18 (2006), pp. 449-57.
- Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), pp. 2149–2154.
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. and Doumbo, O.K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415** (2002), pp. 673-9.
- Mital, J., Meissner, M., Soldati, D. and Ward, G.E. Conditional expression of Toxoplasma gondii apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Mol Biol Cell* 16 (2005), pp. 4341-9.
- Morahan, B.J., Sallmann, G.B., Huestis, R., Dubljevic, V. and Waller, K.L. Plasmodium falciparum: genetic and immunogenic characterisation of the rhoptry neck protein PfRON4. *Exp Parasitol* 122 (2009), pp. 280-8.
- Morrison, D.A. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends Parasitol* **25** (2009), pp. 375-82.
- Nakhleh L, J.G., Zhao F, Mellor-Crummey J Reconstructing phylogenetic networks using maximum parsimony. *Proc IEEE Comput Syst Bioinform Conf* (2005), pp. 93-102.
- Narum, D.L. and Thomas, A.W. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of Plasmodium falciparum merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 67 (1994), pp. 59-68.
- Nishimoto, Y., Arisue, N., Kawai, S., Escalante, A.A., Horii, T., Tanabe, K. and Hashimoto, T. Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus Plasmodium. *Mol Phylogenet Evol* **47** (2008), pp. 45-53.
- Patarroyo, M.E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzman, F., Romero, P., Tascon, R., Franco, A., Murillo, L.A., Ponton, G. and et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 332 (1988), pp. 158-61.
- Patarroyo, M.E., Bermudez, A. and Patarroyo, M.A. Structural and Immunological Principles Leading to Chemically Synthesized, Multiantigenic, Multistage, Minimal Subunit-Based Vaccine Development. Chem Rev (2011).
- Patarroyo, M.E., Cifuentes, G., Vargas, L.E. and Rosas, J. Structural modifications enable conserved peptides to fit into MHC molecules thus inducing protection against malaria. *Chembiochem* 5 (2004), pp. 1588-93.
- Patarroyo, M.E. and Patarroyo, M.A. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. *Acc Chem Res* **41** (2008), pp. 377-86.
- Patarroyo, M.E., Romero, P., Torres, M.L., Clavijo, P., Moreno, A., Martinez, A., Rodriguez, R., Guzman, F. and Cabezas, E. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* 328 (1987), pp. 629-32.
- Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L. and Jarra, W. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect* 2 (2000), pp. 1461-77.
- Proellocks, N.I., Coppel, R.L. and Waller, K.L. Dissecting the apicomplexan rhoptry neck proteins. *Trends Parasitol* **26** (2010), pp. 297-304.
- Proellocks, N.I., Kats, L.M., Sheffield, D.A., Hanssen, E., Black, C.G., Waller, K.L. and Coppel, R.L. Characterisation of PfRON6, a Plasmodium falciparum rhoptry neck protein with a novel cysteine-rich domain. *Int J Parasitol* **39** (2009), pp. 683-92.

- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R. and Lopez, R. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* **33** (2005), pp. W116-20.
- Raj, D.K., Das, B.R., Dash, A.P. and Supakar, P.C. Identification of a rare point mutation at Cterminus of merozoite surface antigen-1 gene of Plasmodium falciparum in eastern Indian isolates. *Exp Parasitol* **106** (2004), pp. 45-9.
- Remarque, E.J., Faber, B.W., Kocken, C.H. and Thomas, A.W. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol* 24 (2008), pp. 74-84.
- Richard, D., Macraild, C.A., Riglar, D.T., Chan, J.A., Foley, M., Baum, J., Ralph, S.A., Norton, R.S. and Cowman, A.F. Interaction between plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the Rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J Biol Chem* (2010).
- Richie, T.L. and Saul, A. Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* **415** (2002), pp. 694-701.
- Ridley, R.G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* **415** (2002), pp. 686-93.
- Ridley, R.G. Malaria: to kill a parasite. *Nature* **424** (2003), pp. 887-9.
- Riglar, D.T., Richard, D., Wilson, D.W., Boyle, M.J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., Angrisano, F., Marapana, D.S., Rogers, K.L., Whitchurch, C.B., Beeson, J.G., Cowman, A.F., Ralph, S.A. and Baum, J. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe* 9 (2011), pp. 9-20.
- Saitou, N. and Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4** (1987), pp. 406-25.
- Saul, A., Cooper, J., Hauquitz, D., Irving, D., Cheng, Q., Stowers, A. and Limpaiboon, T. The 42kilodalton rhoptry-associated protein of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 50 (1992), pp. 139-49.
- Sims, P.F. and Hyde, J.E. Proteomics of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Expert Rev Proteomics* **3** (2006), pp. 87-95.
- Straub, K.W., Cheng, S.J., Sohn, C.S. and Bradley, P.J. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. *Cell Microbiol* 11 (2009), pp. 590-603.
- Straub, K.W., Peng, E.D., Hajagos, B.E., Tyler, J.S. and Bradley, P.J. The Moving Junction Protein RON8 Facilitates Firm Attachment and Host Cell Invasion in Toxoplasma gondii. *PLoS Pathog* 7 (2011), p. e1002007.
- Suh, K.N., Kain, K.C. and Keystone, J.S. Malaria. CMAJ 170 (2004), pp. 1693-702.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24 (2007), pp. 1596-9.
- Topolska, A.E., Lidgett, A., Truman, D., Fujioka, H. and Coppel, R.L. Characterization of a membrane-associated rhoptry protein of Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **279** (2004), pp. 4648-56.
- Treeck, M., Tamborrini, M., Daubenberger, C.A., Gilberger, T.W. and Voss, T.S. Caught in action: mechanistic insights into antibody-mediated inhibition of Plasmodium merozoite invasion. *Trends Parasitol* 25 (2009), pp. 494-7.
- Tsuji, M. and Zavala, F. Peptide-based subunit vaccines against pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Mol Immunol* **38** (2001), pp. 433-42.
- Tyler, J.S. and Boothroyd, J.C. The C-terminus of Toxoplasma RON2 provides the crucial link between AMA1 and the host-associated invasion complex. *PLoS Pathog* **7** (2011), p. e1001282.
- WHO Roll Back Malaria. Aviable: <u>http://rbm.who.int</u> acceso: Febrero 17 de 2011.
- WHO: World Malaria Report 2008. World Health Organization (2008).
- WHO: World Malaria Report 2009. In: Organization, W.H. (Secondary Author) Authors). World Health Organization (2009).

13. ANEXOS

ANEXO 1

Alineamientos en nucleótidos y aminoácidos de PfRON5 de las cepas secuenciadas.

Los puntos indican los sitios conservados.

A. Alineamiento de nucleótidos del ADNc de PfRON5 en las cepas secuenciadas

3D7 FCB-2 Pas-2	АТG •••	TTG ••• 	AAA •••	TAC 	АСТ •••	TTG ••• 	СТС 	АТА •••	ТАТ •••	ATC 	АТТ ••• •	GCG •••	GGT •••	ТАТ •••	TTC •••	АТА •••	тСА •••	GAA •••	АТА •••	тСА •••	AAC 	AAA •••	СТТ •••	TTC •••	72
3D7 FCB-2 Pas-2	GAT •••	ACA 	CTT •••	CTT •••	CCA 	CGA 	ААТ •••	GTC •••	TTT •••	AAA ••••	AAA ••••	ccc 	AAA ••••	CCA 	ТТТ ••• •••	AAG ••••	AAA ••••	ААТ •••	GAA ••••	АТА •••	AAA ••••	AAG ••••	GGT •••	ATT •••	144
3D7 FCB-2 Pas-2	GAT •••	AAG 	GAT •••	GAA ••••	AAA ••••	тст •••	АТТ •••	ATG •••	AAA ••••	ААТ •••	GTA •••	GAC ••••	тсс 	АТА •••	GAT •••	GTT •••	ATG •••	TTC •••	GAA ••••	CCA 	AGG •••	GTT •••	AAA 	AGG 	216
3D7 FCB-2 Pas-2	TTC 	GTC 	ССТ 	тст •••	AGG •••	ACA 	AGA 	AAA 	АСТ •••	CAT 	GTT •••	GTA •••	GGT •••	GGT •••	СТТ 	AGT •••	CAA 	AGT •••	АТА •••	ССТ Т Т	GAC 	CCA 	GGA •••	GAT 	288
3D7 FCB-2 Pas-2	GTG 	GAA 	AAG 	AGC 	AAA 	ТАТ 	GAA 	AAA 	GCC 	GTA 	CGA 	TTC 	ттт •••	GAG 	ААТ 	ата 	AAA 	AAC	GAA 	ATG 	ата 	ААТ •••	ATG 	TCA 	360
3D7 FCB-2 Pas-2	тст 	AAA 	АТТ •••	ААТ •••	AAA 	CAG 	СТА 	GAT 	AGT 	CAA 	GAT 	АТА •••	AGT •••	тсс 	TTG •••	ААТ •••	ААТ •••	ттт •••	AAG 	AGA 	GCA 	тст 	GAA •••	GTA •••	432
3D7 FCB-2 Pas-2	СТА 	AAA 	GAA 	AGT 	СТА 	GCA	ACA	АТG 	CAT 	тса 	TTG 	GAT 	АТТ 	ATT •••	AGA 	ААТ 	GAT 	GGC	AGT 	GTA 	GAT 	TTC 	тса 	AAA 	504
3D7 FCB-2 Pas-2	TAT 	ACA 	TTG 	GAC 	тGG 	ТАТ 	тсс 	AAA 	GCТ 	AAC	АТG 	AGA 	GAA 	AAA 	ТАТ 	тст 	АТС 	GAG 	AAA 	AGT 	АТА 	CAA 	AAA 	ATT •••	576
3D7 FCB-2 Pas-2	АТG 	ААТ 	AAA 	СТТ 	ттт •••	AAA 	AAG 	GCA 	CGT 	AAA 	AAG 	AAA 	AAA 	ААТ 	ATG 	AAG 	AAG 	AAA 	AAG 	АТА •••	GAT 	GCC	ААТ 	ATT •••	648
3D7 FCB-2 Pas-2	GAA 	CAA 	СТТ 	GAA 	ATG 	GAT 	тта •••	тта •••	GTA 	CAG 	AAA 	ТТТ •••	ата •••	ACG	GAA 	ААТ •••	СТG 	AAC	GCA	AGC	AAA 	тта •••	тта •••	AAA 	720
3D7 FCB-2 Pas-2	СТА 	TAC	GAT 	GAC	тст 	GCC	ААТ 	GAT 	TAC 	GTT 	тсс	CCA	ATG 	CAC	АСТ 	GAT 	GTA 	TGT	GGA	CAG 	СТА 	GGA	AGT 	АТА 	792
3D7 FCB-2 Pas-2	ATT 	TTC A A	AGT	тат •••	ATG 	TTC 	GAG	AAG 	GCA	TAC	AAA 	тса 	TCG	ата 	ААТ •••	CAC	GAC	ата 	тса 	тат •••	TTT •••	CAA 	AAA 	TAC	864
3D7 FCB-2 Pas-2	тта •••	сст 	CGT	СТG 	AAA 	ТАТ •••	AGA 	ATT 	CAA 	ААТ •••	ATG 	ATT 	CAA 	AAG 	GGA	ACA	СТА 	тта •••	тта •••	СТА 	GAA 	AAG 	GGT	CTT 	936
3D7 FCB-2 Pas-2	GAT	GAT 	тст 	тта •••	тат •••	ACA	TTT •••	ааа ••••	тсс	AAA 	ATT 	тса 	GAT	ата 	ATG	GAA 	ааа ••••	AAA 	TTT •••	GGA	TTT •••	ААТ 	GAT	ATG 	1008
3D7 FCB-2 Pas-2	TGT	ACG	GAT 	AAA 	TGC	ATG 	GAT 	GAG	АСТ 	АТТ 	AAA 	GCA	GAC	ТАТ •••	GAT	тта •••	тст •••	GAG 	ТАТ •••	AAA 	ААТ •••	GAA	ттт • • •	AGT 	1080
3D7 FCB-2 Pas-2	CCA	TCA	AAA	ACG	GCA	CAA	AGA	AGA	GCA	GAT	TTG	GTC	AAG	TTA •••	TTA •••	ATG	ТАТ •••	TAC	TAC	AGA	GAT	AAA	АТА •••	TAT 	1152
3D7 FCB-2 Pas-2	ААТ •••	АТС 	GAA 	АСТ 	AGT 	GCT 	GAT 	GTC 	GTT •••	TTA •••	ATT •••	ATG 	TTA •••	TTA •••	ТАТ •••	TTA •••	ААТ •••	тсс 	GCA 	ААТ •••	GAA 	CTT 	тсс 	GAA •••	1224
-----------------------	------------------	------------------	----------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------	------
3D7 FCB-2	AAG	GGT	TAT	СТТ	GAT	GTT	AGT	тст	ATA	тса	ACA	GAT	GAT	GAA	TTC	AAT	TTA	ATA	AAT	AAA	ACA	ATT	GAC	AGG	1296
Pas-2	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	
3D7 FCB-2	AGT	САТ •••	AAG	ТТТ •••	ААТ •••	AAA •••	AAG	ATT •••	AAA •••	АТА •••	AAG	AAG	AAA •••	ACG	TTC	ТТТ •••	ааа •••	АТА •••	GCT	ССТ •••	ТТТ •••	ААТ •••	ттт •••	TTC	1368
3D7	CGA	GAA	GAA	•••• ACA	···	GAG	•••	•••• ACA	GGA	••• ۵۵Ͳ	GAA	•••	•••• ۵	•••	····	•••	GAC	олл Сал	•••	•••	•••	•••	•••	•••	1440
FCB-2 Pas-2	•••	•••	•••	•••	•••	•••	••••	•••	•••	••••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	••••	•••	•••	•••	••••	•••	•••	•••	1110
3D7	TTA	GCT	AAG	AAA	тст	CAA	AAT	TAT	AAT	TCG	TTG	TAT	GAA	ACA	ACA	AAA	GAT	TTA	TGG	AAT	CAA	ATT	CAA	AAT	1512
FCB-2 Pas-2	•••	· · · · · · ·	•••	· · · · · · ·	•••• •••	· · · · · · ·	•••• •••	•••	 	 	•••• •••	 	•••• •••	•••• •••	· · · · · · ·	 	•••• •••	•••							
3D7 FCB - 2	ATG	TAT	тст	GCA	TCA	TAT	GGT	TTT	GTA	CAA	тсс	AAA	AAA	ATC	AAA	ACA	AAT	AAA	TTT	GTT	GGA	тст	AAA	ATC	1584
Pas-2	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	
3D7 FCB-2	AGA	ААТ •••	GTA	GGA	TTC	TTG •••	CTT •••	AGA	TGG •••	ТТТ •••	ААТ •••	TAT •••	ААТ •••	AAG •••	ACA •••	CCA	тст •••	AAA •••	ААТ •••	ATT •••	ААТ •••	TTC	TTA •••	GTT	1656
207	•••• ১১Ͳ	••••	•••	•••	•••• ССТ	••• ጥጥ አ	••••	•••	•••• ልጥር	 ДСТ	•••		•••	 стс	•••	•••• ምምሮ	•••	••••		•••• ልጥር	•••	 GAA		•••	1728
FCB-2 Pas-2	••••	••••	••••	•••	••••	•••	••••	•••	···		••••	••••	••••	••••	••••	••••	••••		····	••••	•••	••••	••••	••••	1720
3D7	GAA	TCG	AGC	TTC	СТА	GGA	AAT	TTC	TCA	тст	GCC	CTT	AAG	AAA	ATT	TTT	ACC	СТА	GGA	AAG	AGT	GGA	AGG	AAT	1800
FCB-2 Pas-2	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	 	•••	•••	•••	•••	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	· · · · · · ·	•••	
3D7 FCB-2	CCA	AGA	AAT	TAT	AAC	GAC	TTA	GTT	AAT	ттт	TCT	GAA	GTA	GAC	TAT	TTA	СТА	AGA	ACA	тст	AAG	GCA	AAT	ААТ	1872
Pas-2	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	
3D7 FCB-2	GTT	CAA •••	AGA	ATT •••	ATT •••	ATG	CAA •••	ATT •••	ATT •••	AGA	ATG	TTG	AAA •••	AAG	AAA •••	ттт •••	ТТА •••	TCT	TCT	TCA	ТАТ •••	ACA	ССТ •••	ACA	1944
Pas-2	•••			•••	•••	···		•••				•••		····	•••				•••	•••	•••		•••	•••	2016
FCB-2 Pas-2	••••	•••	•••	•••	•••	•••	••••	•••	••••	•••	••••	•••		•••	•••	••••	••••	••••	•••	•••	•••	••••	••••	•••	2010
3D7	AAC	CCA	AAT	ATA	TCC	AGA	TTT	AAG	AAA	ATC	TTT	TTC	CTT	ACA	TAC	TTT	GTT	CAC	GAG	AAA	GGA	ССТ	GTT	GAA	2088
FCB-2 Pas-2	· · · · · · ·	•••	 	•••	· · · · · · ·	•••	· · · · · · ·	 	· · · · · · ·	c c	· · · · · · ·	•••	· · · · · · ·	· · · · · · ·	•••										
3D7 FCB-2	AAG	GCT	GTA	GAT	ATT	ATA	TAC	AAC	AAA	TGT	CGA	ATG	AAA	ACC	GAC	AAA	ATT	GTT	СТТ	GGA	TGT	ATA	CAT	GAT	2160
Pas-2	•••	•••	•••	•••		•••		•••	•••	•••	•••		•••	•••	•••	•••		•••			•••	•••	•••	•••	
3D7 FCB - 2	TAT	GGA	GGT	AGA	GAA	AAG	AAA	AAA •••	СТС 	СТС 	GGA	СТА •••	АТА •••	AGT	AGA	AAA •••	TGT	AAA	сст	ACA	AAG	АТА •••	AGT	АТА •••	2232
Pas-2	••••			•••		•••	•••	••••		••••	•••	•••		••••					•••					••••	2204
3D7 FCB-2 Pag-2	AGA •••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	ATG	AGC	•••	•••	•••	GAT	•••	•••	•••	•••	••••	AGA •••	2304
3D7	ATT	GCC	GTT	GAT	ACG	GCG	ACA	AGA	TGT	GAT	CAT	•••• TTT	AAT	CGT	AGT	•••• AAA	AAT	ATT	GAT	AAT	GTA	•••• AAA	ACA	 ААА	2376
FCB-2 Pas-2	· · · ·	•••• •••	• • • • • •	•••• •••	· · · ·	•••• •••	· · · ·	•••• •••	 	 	· · · ·	· · · ·	 	 	 	· · · ·	· · · ·	 	· · · ·	· · · ·	•••• •••	 	 	•••	
3D7	AAA	AAT	AAA	ATA	AAT	TAT	GAA	ATA	TTT	GTA	AAG	TCA	GAG	TTA	TCC	ATT	AGA	TAT	ATC	TGT	GCA	GAT	GTT	ACA	2448
FCB-2 Pas-2	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	
3D7 FCB - 2	AAA	AAT	GTC	GTT	AAA	AAA	ATT	ATC	AGA	GAT	GTA	тст	AGA	СТТ	AAA	AAT	ATG	AGA	GAA	GCA	CAA	AAT	GTC	ATA	2520
Pas-2																									

3D7 GAC AAC GGA TTA AAT AGT GTA CAG TAT TTA AAA ATA AGA AAT TAC AGA GAT AAG GAA AGT AGT TTC ACA ATT 2592 TTA TGT CCA TTC ATG GAA GGA AAC GAC AAA AAC ATA AGA GAA CTC GAG AGA ACC CAG ATA TCT CTT TTT ATT 2664 3D7 3D7 CAC AAA AAC ATT GGA ATG TCT AGA ATA ATC AAA GGA AAA TTG ATC AAT ATA TTT AAA AAA ACA CTT AAT ATG 2736 3D7 AGG GAA GGT ATT AAA TCA GAT AGT GCC ATA TCT ATA AAA GTT GGA GCA CGT AAA TAT AAT GGT ATC ATA TTC 2808 ACA GGA GGA TAT CAA TTG AAC GTT GAT AAT TTG GAT CAA AAT ACA CTT CAT ATT GGA TTA TCA AAA ACA AGA 3D7 2880 AAA GTA TAT GAT GGA AGA AAA TAT GTA GAT GAA CTA GAA ATA TTA AAA GGA GAT GGT GTT AAA AAT ATA TAT 2952 3D7 3D7 ATG AAG GGA CTA AAT GAA GAT AAT GAA AGA ATT TAT GAG CTT CAG AAT AAT ATG AGG GTA TCT GAA TTT GAC 3024 TAC GCC ATA CAA AAT CCC GAA GCT AAC ATA ATT GTT TTT GAT GGA AAT AAT TAT ATA TCA TCT TAC GCA CTT 3D7 3096 CGC AAT ATG GGA CTT GAA CAT GAA AGA ATT GTT TGG GCT GGT CCA AGT GTA GGA TGG ACA GCA GAA TTT GCC 3D7 3168 3D7 TTA AGT GCC ATC TCT GAT AAC CCA CTA CCA ATA TTC GAT GGA TCT GCT TGG GTA TTA CTT GAG AAA TTA AGT 3240 307 ATC AGA AGT ATT TTA GGT AAA CAT TTA CCA AGT GAT GTT AAT GGA AAT TCA TTG GCA AAT ACA GTC AAT TTT 3312 3D7 GTT ATT TTA AAC AAA GAT GGA AAA CCA ATA TTG AAA AAC ACA ACA CCT GTT ATT AAC TTA AAA TAT GCT ACC 3384 TTT ACA TTA TCT GGT ATT GTA AAT TTT GTC ATA AAA GCA GAA AAG GGA ATA GGA AAT GAA ATT ATT GTA CAC 3456 3D7 3D7 ACT AGA ATA CCT TAA 3471 FCB-2 ---Pas-2 --- --- --- ---

B. Alineamiento de aminoácidos de PfRON5 en las cepas secuenciadas

3D7 MLKYTLLIYI IAGYFISEIS NKLFDTLLPR NVFKKPKFK KNEIKKGIDK DEKSIMKNVD SIDVMFEPRV KRFVPSRTRK THVVGGLSOS 90 FCB-2 Pas-2 ----- -..... 3D7 IPDPGDVEKS KYEKAVRFFE NIKNEMINMS SKINKQLDSQ DISSLNNFKR ASEVLKESLA TMHSLDIIRN DGSVDFSKYT LDWYSKANMR 180 FCB-2 .S..... Pas-2 .S..... 3D7 EKYSIEKSIQ KIMNKLFKKA RKKKKNMKKK KIDANIEQLE MDLLVQKFIT ENLNASKLLK LYDDSANDYV SPMHTDVCGQ LGSIIFSYMF 270 FCB-2L.... Pas-2L.... EKAYKSSINH DISYFQKYLP RLKYRIQNMI QKGTLLLLEK GLDDSLYTFK SKISDIMEKK FGFNDMCTDK CMDETIKADY DLSEYKNEFS 360 3D7 FCB-2 Pas-2

3D7 PSKTAQRRAD LVKLLMYYYR DKIYNIETSA DVVLIMLLYL NSANELSEKG YLDVSSISTD DEFNLINKTI DRSHKFNKKI KIKKKTFFKI 450 FCB-2 Pas-2 APFNFFREET OEKTGNESIF AIDDIIKTSL LAKKSONYNS LYETTKDLWN OIONMYSASY GFVOSKKIKT NKFVGSKIRN VGFLLRWFNY 540 3D7 FCB-2 Pas-2 3D7 NKTPSKNINF LVNNFSPLVS ISLOLVFFIT TMIEOYESSF LGNFSSALKK IFTLGKSGRN PRNYNDLVNF SEVDYLLRTS KANNVORIIM 630 FCB-2 Pas-2 3D7 QIIRMLKKKF LSSSYTPTLL AQYMSIFLSL WVFEGENNIS LQNPNISRFK KIFFLTYFVH EKGPVEKAVD IIYNKCRMKT DKIVLGCIHD 720 FCB-2 Pas-2 YGGREKKKLL GLISRKCKPT KISIRKRSIR KILNKLMSSL NDPVDILRIA VDTATRCDHF NRSKNIDNVK TKKNKINYEI FVKSELSIRY 810 3D7 FCB-2 Pas-2 3D7 ICADVTKNVV KKIIRDVSRL KNMREAQNVI DNGLNSVQYL KIRNYRDKES SFTILCPFME GNDKNIRELE RTQISLFIHK NIGMSRIIKG 900 FCB-2 KLINIFKKTI, NMREGIKSDS AISIKVGARK YNGIIFTGGY OLNVDNLDON TLHIGLSKTR KVYDGRKYVD ELEILKGDGV KNIYMKGLNE 990 3D7 FCB-2 Pas-2 DNERIYELQN NMRVSEFDYA IQNPEANIIV FDGNNYISSY ALRNMGLEHE RIVWAGPSVG WTAEFALSAI SDNPLPIFDG SAWVLLEKLS 1080 3D7 3D7 IRSILGKHLP SDVNGNSLAN TVNFVILNKD GKPILKNTTP VINLKYATFT LSGIVNFVIK AEKGIGNEII VHTRIP* 1157 FCB-2 1157

Alineamiento de secuencias homólogas en diferentes géneros y especies del filo Apicomplexa.

P.falciparum P.vivax	10 	20 	30 	40 	50 	60 	70 	80 	90 	100 	110 	120
P.knowlesi P.chaubaudi P.berghei P.yoelii B.bovis T.parva T.annulata T.gondii N.caninum	MAI MIKKKHKTDKNGSII MNKKKNKIDKNCSII MAEFTWRPLLM	LFWILYSAIS EHVYNFNQIT EHVYNFNQIN SLPKMIAFFH MIASVQ	SLCVASDVSLL CLUHNHKLKFQ ILLHNHKLKYQ ILLFSGALAA SILLFSGVLAS	QNPFGMDTPI NRHWRLICLI NRNWRSICLI AAGSPAADLV	PVVNLLQLGT LIILVFYNVR LIIVLLYNVR ASVQTVSNER	PRDSIPLTGSI GVGCELASIN TVGCELVGLN -KDLYARDTQ GQGLLVSDAL	LPAAKKVADS PGLPPGVNPE SNLSTGINPE PTARTGIDIG	VLSMAGDAT LIKHSVNLA LLRQSLDLA VSFTQQA PAISLSQQA	QKGGQLTDML QQSRRRSQSK EKSRKRTNSG SGNARTFEIR AQKTRVFG	SEKIGKPI VPRNKLNKSF(LPKNKSHKTF(QHGSGPPRPA)	SNIMHNANVQ DNSTTGSSNI DNTSTSTSTS PRRAAAVADI PG-GSAAADI	DLKNKVA DSDSDGS SSSYTSA IFGSEDF DLFGGEDF
	130 	140 	150 	160 	170 	180 	190 	200 	210 	220 	230 	240
P.ralciparum P.vivax P.knowlesi P.chaubaudi P.berghei Pyoelii Bbovis Tparva Tannulata Tgondii Neospora	SAVTTAAQPLHKIHI GDDSI GSSDISSSSGSDDSI SPPPMNVAGAPLRDI SPPPMNVAAAPARHI	DTIKEKTSVS DVELPFRTDS DDEAPVKTDS 4GVHFLECQA	SPPSPVAHVQG SEVYTRKKLSK GLYKKKDLQK TDGKIECTGQ	NPEKPQPTKT DKRNRRFTDI DRPNRILTDI GAGARPPFFF	DAVMPDSNFP ETHKRRPINP EVRKRRPTKP RGGVDPTEIHE RGGIDPMEVHE	TIDGANASED LTKYPSDDQS LLNSRSDNEP IVQSRTVGPA ILQSRTVGPA	JITPAVP EENKPTDKTF RENE DYDEERPEQT DYDEERP	VAA LLDTPLKEKI 	PDVPKPVPDV PKVVKPVPIN PKVVRPTPTR DVVTLQRFVS DLVTLQRFIS	QPKFDNGEPE PNDKNKPKLSI PNDQNPPEPSI SANASNSPLLI SANGSNSPLLI	ANAVPAGENA EATPILTKTK KTEDKPE EDPVQVCLSF EDPVQVCLAF	QPKEEQK DKDEKIG TPNEKIG RKPTYTC RKPTYTC
	250 	260	270 	280 	290 	300 	310 	320	330 	340 	350 	360
P.falciparum P.vivax P.knowlesi P.chaubaudi P.berghei	MLKYTLLİYIIA MLKYVLLLCATL MLKYVLFFCATI MMKLSILIYLVA	GYFISEISNK AYVPVEIESF AYAPLGIESF FYYASEANGK	LFDTLLPRN- RFFENMITPK- RFFENIITPK- LHDVLVPKN-	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			VFKKPK LHVGRE LHFGRN LPLIKN	PFKKNE PIKKN PIKKN FHKNDG		IKKG ⁻ LKKGK LKNGK KLKND	ENIS KNIS NKNS	IDKDEKS LDKLEKN LDKIEKN FDNYEKK
Pyoelii Bbovis Tparva Tannulata Tgondii Neospora	IEMEELPTSSVKVT PFSERLLRPISDNVI PFSERLFRPISDNII HLLHEFAATSVIVEI QLLHEFAATSVIVEI	/DESPSGESI DFNNLPFNTN DFSNLPFNSN ESGNLVCEDK ESSNLVCEEF	TDNANSDEAI ITNTNTTETNS ITTSNTTSK APLTVAEKRK APLTIAEKNK	TVSG NDSTTKTNTA KDK INDAVKAG INEAVKG	ADSTTNTTSPN	G PLNPNTGNNG RTPQATG KTSQIGV	TTSATVVKTE VKKMTPPNSF FKRMTPPNSF GQSSRPPNP1 GQSPRPPAR1	PEPSPDAGEI PTMTAESGSG TITSES VSPSKAGAA NASPSGSGA	ISAGYDEKDM SSDDFDVNEV - DDFDLHEV PQNAASRQAV PAQGSSPSQG	QKEGDATAMN EAVKKSK EVVNQSK SFVEQENSEA IFAELEG	LNDV LDPS VDPS SMPTANTEQA TQEAF	'IEGGKDG ITQGLGN ITQGREN SATTEDT 'TENEEDG

	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
D folginorum		I		I	57M							
P.Iaicipaium P.vivay	IMKNVDSID				VM	IFEPRVAREN	/PSKIKKIHVVC	GLSQS		VEKAVREEN VEKALBELEK	TENEMINMSSE MNNEMINMSSE	.ТПКОТ ТПКОТ
P.knowlesi	TMKNVDSTN				VM	IFDPKDKKFV	/PSKSKKAHIVC	GFSON	TSDPSDVERSI	YEKALRELEK	MNSEMIVYSTK	TTREL
P.chaubaudi	MLSDSGSIN				VM	IFDPRMKKVV	PSKMRKOHVVO	GFAON	-TVDOSDVEMG	KYETALRFVEN	MNNOMLVLAKE	INSAL
P.berghei												
Pyoelii												
Bbovis	MSKMTMSVDQDWL	N		-KERAVEAMQ	KALPTGTSY	SYKKGARLI	TPISETPRMMA	GVLQT		RYKESVQIEHD	LRLRVSRETAD	VIALL
Tparva	SIPRKSQVSGTQ-				IPVATSF	'EYNRSAHVI	LEPKFEKPKVMO	GIIQT	-LTDKESKLRR	4TKRKLRIQHC	LTLYISKESAN	VVNML
Tannulata	IITGKPQISGTE-				IPVATSF	'EYNRTAHVI	LEPKFEQPKVMO	GIIQT	LTDKESKLRRN	INKRKLKIQHD	LTLYISKESAN	VVNML
Tgondii	KIASAATDSGDYG	EAAAGESAQEC	BDRPPPYNPDA	DEAGVPRAVQ	EAYEEARPL	QEATIDKF	QDAAAAAEAAD	HFAQVSAFI	NAMQSALTKISA	GYHLRAGAHVV	LSACKRLVEAV	AANPP
Neospora	RGAQDRTPDEEY-	Q-	RPPPYNPDA	TDSGVPQAVQ	DAYEEARPL	QEATIDKFI	RDASAAAAAA	OQFAQVSAYI	IAMQSALTKISA	GYHLRAGCHVI	LSACKRLVEAV	AANPP
	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
	490	500	510	520	550	540	550	500	570	500	590	000
P.falciparum	DSODISSLNNFKR	ASEV-LKESLA	ATMHSLDIIRN	DGSVDFSKYI	LDWYSKANM	IREKYSIEKS	SIOKIMNKLF	KKARKKH	KNMKKKKIDAN		KFITENLNAS-	
P.vivax	DSOEYKTLSNFKF	ASAL-LKESL	ATMHSLDVIKN	DKTVDFTKYN	LEWYAKASL	KEKYETEKY	IHRLMNKMF	KTAGKKH	KNVOKKKIDEN	LEOLENDLLMC	RFVSENINVS-	
P.knowlesi	DSQEYKTLSNFKR	ASAL-LKESLA	TMHSLDMIKN	DKTVDFNKYN	LDWYNKASL	KEKYETEKY	IHRIMNKLF	MKASKNH	KKNVQKKKIDEN:	IEQLENDLLMQ	RFVSENMNVS-	
P.chaubaudi	ENEKYIALEGYNR	LSSI-MKEPLA	ATMYSLDSLKN	ATTIDFSKYD	TDWYANATM	IKDKYEAAKH	ILQATIEKFF	KTSNTH	KSVSEKKINEN	IKQLETDLLIÇ	RFVMDNSNAS-	
P.berghei												
Pyoelii												
Bbovis	SNGSLAELKSEHF	LVFSRLVEPLE	KASIALNHVRK	SAQNIISFYD	RNWYVRASP	YEKATLLDI	VIRKDTGKPDLY	AHKVKKPQI	(MTPEKERVYNII	LDGYFNDYQCQ	KIIRGNQVAR-	
Tparva	NNGEVGKLQKVHF	LVYLRLQEVFQ	2SQYALNQLLK	KDGDKVKRYD	KNWYLNSTP	TAKASFIE	EIRKYTKEPELY	GKFKQ-PKI	(MKESRKLVYEK)	LELFHNDYICQ	RIVRENQFSD-	
Tannulata	NNGEVSKLQKVHP	LVYMRLQQVFQ	2TQYALNQLLK	KDGEKVKIYL	KNWYLNS'I'P	TAKASFIEL	SIRKYTKEPELY	GKFKQ-PKF	(IKKSRKLLYEKI	JELFHNDYICQ	RIVRENQFSD-	DECET
Neospora	GPGIVIPLEELRE GPGTVI.DI.DFI.PT		ALAQAF IDIAI	NTVHSAUETI		LELSGIEEI	TNHTARVKSRL	AARGQ-DSI	VANAKKEIAGESI SUMAKKEIAGESI	FROLKMET FOR	TVAKVCOVMDN	DNAVT
Neospora	GFGIVLFLDELKI		THOAT DD I AP	INT AUSTALIT	II F QH VANAL		IIMIIAKVKSKI		ANVAREIVRESI	r Konkhenl ör	TVARVCQVMDR	FNALL
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720
		I									I	
P.falciparum	К	LLKLYDDSANI	DYVSPMHTDVC	GOLGSIILSY	MFEKAYKSS	INHDISYFO) KYLPRLKYRIC)NMIOKG-	TLLLLEKGLDI	OSLYTFKSKIS	DIME	
P.vivax	K	LLKEHEGKSPN	YISPMHSDVC	GQLGSTFLSF	MFEKLYKSA	MSHDLPHF	KQYLPRLKQRIH	––QMIHKG-	TLILLEKGLDI	DALHTFKLKVA	ELMQ	
P.knowlesi	K	LLKEHEGKSPN	NYMAPMHSDVC	GQLGSTFLSF	MFEKLFKSA	INHDIPHF	QYLPRLKHRIE	INMVHKG-	-TLILLEKGLDI	DALHTFKLKVA	ELMQ	
P.chaubaudi	M	ILLKKYEDNGNH	XYLAPWYTDVC	NQLGHPILSY	VFEGTYKHS	VNNSLEFF	KKYVPKLTTKII	KMVENG-	HIILVDRMFQH	ISLDTFKNKVS	TLMN	
P.berghei				LGHPIISY	VFESTYKHC	VNNRIDFF	KKYFPKLTTKLI	KMVENGN	ISHIALVDRYFG(OSLDDFKNKVS	NLMN	
Pyoelii						MIS	SNLVLKILIK	EEE-	IVIYD			
Bbovis	Ç	MLNMFDQASGI	LYVAPFYTDVT	PTLGSSWLIQ	RFENFYSRS	EYLRADILA	AQAMPQLIGRFM	IVMAENG-	TILPTSTDVQI	LNLYSLAAVLS	KIMDGVTEPTT	FLGKR
Tparva	K	LIRSFEQOSGI	LYIAPNYHNLV	PGLGNLWLIK	NFERYYMEA	SRSKVTTFS	SKVAPSLVGKFM	1LMVENG-	TVLPSPPSSQV	AIHSLSIILS	MVMEGVREPQL	FLGKK
Tannulata		LIKSFEQQSGI	LY LAPNYHNLV	PGLGNLWLIK	NFERYYMEA	SKSKVTTFS	SKIAPTLVGKFM	ILMVENG-	TVLPSPPSSQV	AIHSLSVILS	MVMEGVREPKL	FLGKK
Neognora	OTVPIIVGTTPTA				PSAPADEGL	VOF PKHNLO		ARTATARKE OTVTADVES	FKTTDFCDCDF	Ί ΤΕΛΟΕΊ GKA	ATATLUAP	AA
Menshora	QIVEVIVGQ5PMA	LETLEGUTGEUTEAL	ATT TUTKINDPC	UVIASDAUIF	FSAFADEGL	INDE EKUNLO	• •	ATT TAKKE	•	LTLASCAMKA	.VIY9TANTAN	AA
						•	•		•			

	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840
D (] '											I	
P. raiciparum	KKFGFNDMCTDKCM-	DE	STIKADYDLSEY	KNEFSPSKI	L'AQRRADLVKLI	MYYYRDKI	IYNIETSAD	VVLIMLLYLN	S			ANELSE
P.VIVAX D. knowlogi	KKFGFVDMCSNKCI-		TVNASIDLEE I	QNEF KPTN WNEEKDEN	CORRADMVKML	MVVVDDVI	NNTETTAD	FVLLMLLYLN	5 c			ATEHTE
P.Knowlesi D.showhoudi	KKFGFVDMCSTKCV-		DTVNAN I DLEE I	KNEF KPTNI			INNIETTAD	FVLIMLLYLN	5 c			ATEHTK
P.Chaubaudi D. howehoi	TRVGFTDMCSKKCF-	El	DIVEEKIKIDKI					TTLIMLLHLS	5 c			SAKTIE
P.Dergner	KKVGFIDMCSKKCF-	DI	DITEINIKLDKI			LIIIKELI		IVLIMLLHLS	5 c			SAKTIE
Pyoeiii			VCTVENET					TATUTAT	5 mN			SANTIE
BDOVIS	KFIGIMGMCDMSCA-				HNKQREILKWV		TERIDISIÓ	KLLVEIMFRT DUTIGIMVAT				MKIRPSNKKV
Tparva	KFIGFMSLCDIKCI-		LIDNDAVAIIE	RGVGKKGI	CPPAUOFI KWU			RVLLSIMIAI	ΙΚΕυΓΙΚΘΟΡΚ Ποσοσνοποοο	NVQLKIQSQFI	NOVLOOPLI	TOODADIAE
Tannulata			LIDND-NKSAP	MET ODUCNI	GRRAVQF LRWV			VET MET NAAM	IKEDF IKISFK	r TVQLVIQ2013	IKKSIPSPI	PODIDDIDE
Neegnera	DADGEVCIECCCDA	NVNDIMKSI	AFFDMILHQSGF			LLQNDGI		VELMELNAAM		F	VAAN-KSI	
Neospora	*	NVNEIMEB	KIF DMI I HHSAF	MKLQKHGNI	JNSKOKLUKVA	птбирет	РОТЕТЕТО	I CLMCL I AAM	002	r	VAAP-KGII	LIKKKAKNSP
	•				• •			* •				
	850	860	870	880	890	900	91	0 92	0 930	940	95	0 960
P.falciparum	KGYLDVSSISTDDE	FNLINKTII	DRSHKFNKK		IKIKKKN	FF <mark>K</mark> IAPF1	IFFREE		TQEK	TGNESIFAIDD	IIKTSLLA	KKSQ
P.vivax	KGFIDVSSISTSDK	FNLLNTTII	DKRKKVKK		NKRKS	FLKIAPFN	IFFREE		PDER	YGNESIFAIDD	IIKTCLLA	KKSQ
P.knowlesi	KGFIDVSSISTTDKE	FNLLNTTII	DKRKKVKK		NRRNS	FLKIAPFN	IFFREE		PDEK	YGNESIFAIDD	IIKTCLLA	KKSQ
P.chaubaudi	AGHLDIDITQTSNK	KNLMLLAGE	EGD		KKSKRN	LF <mark>R</mark> IAPYI	KFFRD		PQDE	SYTASIFAIDD	IMKTCSLS	KKFK
P.berghei	SGRLDIDITQTTSKQ	2NLINLAIE	ENDKVINI		YKKSKRN	FLKIAPF	(FFRD		PQDK	SYSASIFAIDD	IMKTCSLS	KKFK
Pyoelii	SGRLDIDIAQTTDK	HNLIHLAIF	END		KKLKHS	LLKIAPFI	KFFRD		PQDK	SYSASIFAIDD	IMKTCSLS	KKFK
Bbovis	NIHLKSEYVDPNAN	ESLLELPHI	LMGYVNKIPG		RVKQIP <mark>R</mark> A	IG <mark>N</mark> MQAPI	EFLTNVSKR	PNFHRLG	NVIDHAGNSFN	RFMSGYRVPGR	IVDNKLEG	RNISPYN
Tparva	PSMLEVGPDAREREI	LREANRRLI	LEDYNRRRQEEY	EKRRREQY	KDPHKQYKNR <mark>Q</mark> E	YL <mark>R</mark> DQMGI	RVLDEQSKE	VHKQKAEREK	QAFEDALNGSD	TFQKAMRQREE	ILRRARYN	SRMPSNDVEN
Tannulata	PSLLEIGPDDRERKI	LREANKRLI	LEDYNKRRQQEY	ERRRSEQFE	ENPRKEYTSROE	YLRDQSGI	RVLDEQSKE	VNKQKEQRAR	EAFENALKGSD	TFQKSMRQREE	ILRRAKYN	SRAP-DYGEQ
Tgondii	YGYLDLCDVACYQK	IDRLHNDVN	4TNVFFSLDTTI	JMKIVAKVHI	RSYGIAKA	FFQLGAR	QHIADPN-	LGM	WARRLFVHWAS	HNEVKQMQGQK	VVKVNYEN	LRHG
Neospora	YGYLDLCNVACYQK	VDRLHNDVN	ITNVFFSLDTTI	MKLVGKIHF	RAYGIGKA	FF <mark>Q</mark> LGARI	DQQIADPN-	LGM	WARRLYEHWQS	HNEVKAMKGEK	PVKVDYKN	LRRG
	:. :				•	•					:	•
	070			1000	1010	1000	100			1000	107	. 1000
	970	980	990	1000	1010	1020	103	0 104	0 1050	1060	1070	1 1080
D falainann		I				I		I		I		
P.IalCiparum			NINSI	YETTKDLWI	NQIQNMYSASYG							
P.VIVAX			NECCI	VETTKEVWI	NELUSIISASIG							
P.Knowlesi			NF 551	VETTKEVWI	NIQNIISASIG							
P.Cnaubaudi D.howrhoi				YEKTKGLWI	DEIQTLYSASYG							
P.Dergner			NYDSI	VEREKTKGLWI	DE LONT I SASIG							
Pyoeiii						T 17N1				T DCCC		
BDOVIS					UGLLQMIEVAVL					LK333		
Tparva Tannulata	ERSEFINIADN-INI				KFINMFMSGIE	EPGKSVNI	ENISEQII.	DEUVERTONN	GRVSGSVGIDA	Ο ΕΤ Ο ΥΥΝΝΤΠΕ Ο ΕΤ Ο ΥΥΝΝΤΩΕ	ם אמאבות דות. מאמא דות די	
Tannutata												
Neosnora					BAGNWI RYDDI	TR				DL	'MN	
меозрога			 5r1fL	1 I KHKDALI						Dv	1.111	 11 v v 11 1
					•							

	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
P.falciparum	FVOSKKIKTN	IKFVGSKIR	NVGFLLF	RWFNYNKT-	-PSKNINFLVN	NFSPLVSISLOI	.v		ا 	FFITT	MIEOYESSFL	GNF
P.vivax	FVAGKKLKTK	SFIASRIR	NVGFVFN	WFNYNAK-	-ASPHVNFLVH	NFSPLLSVSLQI				FFIST	MIEQYEASFL	SNF
P.knowlesi	FVASRKLKTK	SFVTSRIR	NVGFVFN	WFNY <mark>N</mark> MK-	-PTPHVNFLVH	NFSPLISVSLQI	T			FFIST	MIEQ <mark>YE</mark> SSFLS	SNF
P.chaubaudi	FVPSKKIKAQ	QS <mark>F</mark> IA <mark>S</mark> KIR	NVGFLFF	KWLNTNDI-	-SSTNANFLVK	NYS <mark>PLAS</mark> LS <mark>LQ</mark> I	T			FFINT	MIEQ <mark>YE</mark> SSFLO	∃−−−NF
P.berghei	FVPSKKIKTQ)SFIL <mark>S</mark> KIR	NVGFLFF	RWLNNNEL-	-ESNDVNFLVK	NYS <mark>PLVS</mark> LS <mark>LQ</mark> I	T			FFIST	MIEQ <mark>YE</mark> SSFLO	∃−−−NF
Pyoelii	FVPSKKIKTQ	QS <mark>F</mark> IT <mark>S</mark> KIR	NVGFLFF	RWLNNNEY-	-TSSDVNFLGK	NYS <mark>PFVSLSLQ</mark> I	SESKRADSI	FCSFCPFCYFF	PILFIFPHF	FHFLA <mark>FF</mark> INT	MIEQYESSFLO	∃−−−−NF
Bbovis	WVQLQSFHSAIH	ISFEYQSSRKRI	S-SKTLGAIFF	RYLNTS	-VGKHIEGMPK	QFLPFTSLVLQ	[C			FFIED	AVDGYRRGKYI	XRL
Tparva	IIMIRSIHLALE	ISF'ENSKQKK1'I	S-SKTFGSLFF	RYLN'I'D	-SNGYVMNL'I'K	QFLPATSLSLQI	,1			FF1QE	LVERYHHGIIO	jLL
Tannulata	IIMIRSIHLALP WILLIDCUDNAAN	ISF DNNKTKUIM		KI WYECDI			_1				LIERINHGVLU	JLV
Neospora	WIHIRGVRNAAM	IGF KNSQKLNES	TGESAIGAVEE	KTWAEND-	SAABHÕETVL SAABHÕETVL	FGAPLASMALQ	[G			FFLHT	VVEEIKMSLLI TVFF <mark>VKMS</mark> TLI	TRAGAQI
Neospora		*			SVVANIQEINF	* * * • * * *	LG			rrbhii **•	: *	SILAGAQI
		-										-
	1210	1220	1220	1240	1250	1260	1270	1200	1200	1200	1210	1220
	1210	1220	1230	1240	1250	1200	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
P.falciparum	SSALKKIFTLG	SGRN-PRNYND	LVNFSEVDYLI		ORIIMOIIRML	KKKFLSSSYTP-	TI	LLAQYMSIFLS	LWVFEGENN	ISLONPNISR	FKKIFFLTYF	VHE
P.vivax	SSTLKKIFTLGA	ASSAH-PRNYAD	LVSFSETDYLI		QRIITQTVKML	KKKFLSLPYTP-	TI	LLAQYISLFLS	LWVFENERN	I <mark>SLENPN</mark> VTR	FKKLFFLSYF	VHN
P.knowlesi	SSTLKKIFTLGA	ASSAH <mark>-</mark> PKNYAD	LVSFSETDYLI	GRH <mark>S</mark> KTDKA	QRIITQTVKML	KKK <mark>F</mark> LSLPYTP-	TI	LLAQYISLFL <mark>S</mark>	LWVFENEKT	I <mark>SLENPN</mark> VTR	FKKLFFLSYF	√HN
P.chaubaudi	SSALKKVFTLGK	KSGAN-PKNYSD	LISFSETDYLI	LRT <mark>K</mark> KADAV	QRIINQTIKVL	KKKFFSAEFTP-	TI	LFAQYVSLFL <mark>S</mark>	LWVFEGQKD	ISMNNPNISR	FKKLFFLSFL	√HK
P.berghei	SAAIKKIFTLGK	KSGTN-PKNYDD	LISFSETDYLI	LRT <mark>K</mark> KADAV	QRIINQTIKIL	KKKFFSGEYTP-	TI	LFAQYVSLFLS	LWVFEGEKD	ISMNNPNISR	FKKIFFLSFL	JH <mark>S</mark> KFFF
Pyoelii	SAAIKKIFTLGK	SGAN-PKNYDD	LINFSETDYLI	LRTKKADAV	QRIINQTIKIL	KKKFFSGEYTP-	Tl	LFAQYVSLFLS	LWVFEGEKD	ISMNNPNISR	FKKIFFLSFL	JHN
BDOVIS	KNFLTGILTLGI	KSRLGPSNITE	LQSYLEPQVVY		RALISNLVQDF	KLMFLNKPAIP-	MI T	PIIQAISMFLG	MWARGSSAK	LDLSDPTIDT	SRRIFFLNYM:	SNK
Tparva Tannulata	KKFFKNLLFRGI	I I RAPINF RU	T NNNT STVVT		LETVHQLVKMF	KDSFITKASIP-	1			FNISDRSENI FNISDRSENI	CORMETICATION	
Taondii	KSWFVGMFOKNK	RRTV-PRTWKA	VVAATNRAPKI	/NI.KAYOGA	TTYLKTTAKME	RERFLYRFYMOG	GGSKVDFN	ΓΡΤΙΤΙΤΙΟ	SWMDPSLDR	LELSSRTIPN	AKKI, FWYYVW	VNE
Neospora	KSWFLGIFOKNK	RRTV-PRTWKA	IVAATTRKPIN	/NLKAYOGA	LMVIKSLAKMF	RERFLHRFYMOO	GOGTKVDFN	PTLLIHALVA	LWMDPTLDR	LDVSSPSIPN	AKKLFWYYLW	VNE
	: :: .	* .	:	•	: ::	: *:	2	: ::.	*		:::*	:.
	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	1000	1010	1000	1000								
P.falciparum	F	GPVEK<mark>AV</mark>DIIY	NKCRMKTDKIN	/L <mark>G</mark> CIHDYG	GREKKKLLGLI	SRKCKPTKISI	RKRSIRKIL	KLMSSLNDPV	DILRIAVDT	ATRCDHFNRS	KNID	
P.vivax	8	GPAEK <mark>AV</mark> EIIY	DRCRGKTDKI	/L <mark>G</mark> CIHDYG	GAKQKKLLGII	NKQC <mark>K</mark> PTKIPIF	RKRSIRKVI	KTLMSSLTDPV	DILKIAVDT	ATRCDHFSRS	ASMD	
P.knowlesi	S	GPAEK <mark>AV</mark> EIIY	DR <mark>C</mark> RGKTDKIN	/L <mark>G</mark> CIHDYG	GAKEKKILGII	KKKC <mark>K</mark> PTRIPIF	RKRSIRKVI	KTLMSSLT <mark>DP</mark> V	DILKIAVDT	AT <mark>RC</mark> DHFSRS	APMH	
P.chaubaudi	8	GIVEK <mark>AT</mark> EIVC	KN <mark>C</mark> QHKTKKIV	/L <mark>G</mark> CIDDYG	GKDKTKILGLF	TRKCKPTIVPIN	KRSVRKIL	KVLMTTLTDPI	DILKI <mark>AADL</mark>	AT <mark>RC</mark> KYYNDA	AP	
P.berghei	FINRYFFVLFYS	GVIEK <mark>AT</mark> EIIC	KSCQKKTKKIV	/L <mark>G</mark> CIDDYG	GKTKKKILGIF	SRKCKPTIVPIH	IKKSVRKIL	KVLMTTLSDPI	DILKIAVDL	ST <mark>RC</mark> KYYNDS	SS	
Pyoelii	8	GVVEKATEIIC	KSCQKKTKKIV	/L <mark>G</mark> CIDDYG	GKTKRKILGIF	SKKCKPAIVPIE	EKKSVRKIL	KVLMTTLSDP I	DILKIAVDL	STRCKYYDDS	S	
Bbovis	Y	DLAMTATEIVV	QHCAAAAPVLH	ILGCVPRNV	'KG	TVKCKNVAIPT	TKYHVLKVM	OMMDATFEDPL	DIIRVGSDL	ARRCIAMPVR	KNVVVK	
Tparva	F	SLADMATEMVI	QHCAG-LKMLH	ILGCVSKLN	NN	NKECKDYSLLL	KKKVLRIM	MIESTSMDPL	JVIRIASDT	CRRCVANLTV	RPHVGAPTLL(2MEQDLD
Tannulata	h	SLADIATEMIL	KHCAG-LKMLF			NKECKDFSVLL	KKKVLYIM	KMIESTSMDPL		CKRCVANL'I'V	KPHVGAPTLL(JPDÓ2PD JPDÓ2PD
Neospora	N		TGCKK-YTFLI		``````````````````````````````````````		ROOLEAIMI			AAKCEGISAA		JPAKVKK
пеозрога	r		* • •	* :	IAIG-EVVEAG	* ;				**	INDOAT KIIDAKI	JĀL KRĀK
			•	-		· · · · ·				-		

P. falciparum N	1560
Disport Tparva DGEDDDLEDVEDSYLELDEGLEGGGGGGCLDCLGCCNRKKNQETTSTSNSNSNPNSNSGGKDSSTDKDLSTNSASGQSTSTSRSGFGKSGIPCAAGSGTRAFGNPSYLQIPNNSS Tannulata DDDVDDSYLELND	
1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 P.falciparum	FSSNI
P.falciparum	1680
Pyoelii SKKKP Bbovis	NKINY NKINY HKENY HKENY
	HKENY ADSYD NKKWY NKKWY -QDQD
NeosporaSFVEGAVEDETEEESEIDADDSDA	iQDQE ∙
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 	1800
P.falciparum EIFVKSELSIRYICADVTKNVVKKIIRDVSRLKNMREAQNVIDNGLNSVQYLKIRNYRDKESSFTILCPFMEGNDKNIRELE P.vivax DLFVKSELSFRYICADVTKKVVKKIIRDVSRLKNMSEAQELIDQSLNSVQYLKIRNYRDKESSTSIFCPFMEANDKHIRDLE P.knowlesi DLFVKSELSFRYICADVTKKVVKKIIRDVSRLKNMSEAQEIIDQSLNSVQYLKIRNYRDKESSTSIFCPFMEANDKHIRDLE P.chaubaudi DLFVKSELSRHTCAVVTRKLVQKSIKRVSRLKDFSEAPNIIEQTLDSVQYLKMRNHRDPDSTFTVLCPFMQGTDKHIRDLE	RTQIS RKQIS RKQIS RSQII
P.berghei DLFVKSELSLRHTCAVVTRKLVQKSIKRVSRLKDFSEAPSIIEQTLDSVQYLKMRNHRDPNSGFTILCPFMQGTDKHIRDLE Pyoelii DLFVKSELSLRHTCAVVTSMFFFFYKNLFTYFYCDKYISTPIPIIAEKLVQKSIKRVSRLKDFSEAPSIIEQTLDSVQYLKMRNHRDPNSSFTVLCPFMQGTDKHIRDLE Bbovis SAIMFSELAHRYHCYQEQATLVAQINKAMLQTKDMNALSASINDLFKYSRSLTIRQPDHREMGPTLVCPFMEDAPEATRDRY Tparva DPLKKVKNVFKKKMTPEEEAMMLPHFVDRLMLHSEITHRIHCYYTOKTLVKRLIKELKKAKDELDIKOIIANVFGEFRSIEIIOSGMASSIHOLICPFMMESPNELRLPI	RSQII RSQII RERMV OTNIL
Tannulata DPLKNPKNIFKKKLTPEEEALMLPHFVDRLMLHSEITHRIHCYYTQKSLVKRLIKELGKAKDELEMKQIITNVFGEFRTIEIIQSGMASSMHHLICPFMIESPNELRIPH Tgondii SSFVQLKKLFNRRGSSAAGQAVQTDAQPLPK-AVQTDAQPLPKVRRGGPDVDASAVILGSRFMLDLWCSKYREMLVEKLSGISTKDATVMQQEISKVFSAVS Neospora GSFVQLRKLFRRKKKAAAGDKPAQTDAQPQFVRRGRPDVDASAVILGSRFALDLWCSKYRQMVVEKLSGIKTKDTTVMQQEISKVFTAVI	2TNIL SIKIA SIKIA

	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920
P.falciparum	LFIHK <mark>NI</mark> GMSRII	KGKLINIFKK	Г	LNMREGIKS	SDSAISIKV	GARKYNGII	FTG <mark>G</mark> YQLNVD	NLDQ-NTLHI	GLSKTRKVYDG	RKYVDELEILK	GDGVKNIYMKGI	LNEDN <mark>ER</mark>
P.vivax	IFVHKNVGILNLL	KGKVANVFKK	S	INIREGIK	PDSPISIKV	GMRKFNGFL	FTG <mark>G</mark> YQLNMD	SFEQENTLHI	GLSKSRKVYDG	RQFVDE <mark>L</mark> EILK.	ADGVKRIEMKG3	IDEDN <mark>ER</mark>
P.knowlesi	IFVHKNVGILNML	KGKVANVFKK	S	IKIREGMK	PDSPISIKV	GTRKFNGFL	FTG <mark>G</mark> YQLNVD	SFGQENTLHI	GLSKSRKVYDG	RQFVDELEILK	PDGVKRIEMKG	IDEDN <mark>ER</mark>
P.chaubaudi	SYVLKNVGISNII	KGKIHNIFSKI	N	INMREGLKS	SDSVVTIKV	GGRKFNGSL	FVG <mark>G</mark> YHLNVN	DIEQN-ALHI	GLSKSRKVYDG	SKFVDELEILK	EDGIKDIIMKG	IDEDN <mark>ER</mark>
P.berghei	SYVLKNVGIYNLF	KGKLHNLFSKI	N	INIKEGVRI	P <mark>D</mark> SVVTVKV	GGRKFNGNL	FVG <mark>G</mark> YNLNVN	DIDQN-ALHI	GLSKSRKVYNG	TKFVDELNILK	EDGIKDIILKG?	IDNDN <mark>ER</mark>
Pyoelii	SYVLKNVGIYNLF	KGKLHNLFSK	S	INIKEGVKS	SDSVVTVKV	GGRKFNGNL	FVG <mark>G</mark> YNLNVN	DIDRLYV	LSTGER	VSEFDYAK	ENPNGKFICQLY	YNKTY <mark>NK</mark>
Bbovis	KYAAS <mark>KM</mark> TIRRKI	IQEIKVLGAS	YASDLPIANF	RKSSSSSAPLI	E <mark>S</mark> IAGAILV	GTRQFDGIF	FYG <mark>G</mark> Y-PPPE	KIPMPESVTV	NPGDG <mark>R</mark> VVYHN	KEFIAE <mark>V</mark> VALK	PLGVNAVMLEKÇ	JNKVT <mark>KR</mark>
Tparva	QYVIK <mark>QL</mark> VSKYKL	NPIKKDLFKQ	FRGKINEL	-VPDLEGYMKV	VDVVGSVFV	GLRKYNGIY	YSG <mark>G</mark> Y-APFD	KIDKPTNILL	KPGEG <mark>R</mark> LVYDG	DNFVPELTALN	DIPSLESINII	HEYDY <mark>DR</mark>
Tannulata	RYVIA <mark>QL</mark> CKKNKL	NPVKKDLFEQ	FRGKIGVL	-VPDLEGYLK	I <mark>D</mark> VVGSVFV	GLRKYNGIY	YSG <mark>G</mark> Y-APFD	KIDKPTNILL	KPGEG <mark>R</mark> LVYDG	DNFVPELVALN	DIPALESINIIF	HEYDY <mark>DR</mark>
Tgondii	IPDYK <mark>DL</mark> WDFSLR	CDWMDGYPDA	EKMRAARA	-EMVTYAMAKA	A <mark>S</mark> TGKRLKR	MLQKVRSWI	RKK <mark>A</mark> FAAARK	LKSLKNRIST	AFGRG <mark>K</mark> PPKAK	VPDWAVVNAGV	GMWTGKVFSTDI	LTFNEDE
Neospora	LPDYK <mark>EF</mark> WDFSLR	CDWMDGYPDQI	DRMRAARA	-DMVSYAMAKA	A <mark>G</mark> RGKRLKR	MLQKATSWI	RKK <mark>A</mark> FSVAKR	FKSLKRRISN	AIGKG <mark>K</mark> PPKAK	VPDWAVINVGL	GSWTGKVFSTQI	LTFNEEE
					. :		.:	:	:			
	1930	1940	1950	1960	1970	1980	199	0 200	0 2010	2020	2030	2040
P.falciparum	IYELQNNMR	VSEF	DY <mark>A</mark> IQNPDAN	NI <mark>IVF</mark> DGNNY	IS <mark>S</mark> YALRNM	GLEHERIVW.	AGPSVGWTAE	FALSAISDNP:	LPIFDGS	AWVLL-EKLSI	RSILGKHLPSDV	VNG
P.vivax	FYVLQDKTK	VPEF	EY <mark>A</mark> ILYPSAI	DI <mark>IIF</mark> DGNNY	VS <mark>S</mark> SALRDM	GLEYERIVW.	AGNTVGWVAE	FALGTISENP:	LPIFDGH	AWVLL-DKLSV	KSILGEFLPRDV	VRG
P.knowlesi	IYVLQDNTK	VPEF	EY <mark>A</mark> ILYPSAI	DI <mark>IIF</mark> DGNNY	VS <mark>S</mark> SALRDM	GLEYERIVW.	AGHAVGWAAE	FALGTISENP:	LPIFDGH	AWVLL-DKLSV	KSILGEFLPRDV	VRG
P.chaubaudi	LYVLSNGEK	ISEF	EY <mark>A</mark> KENPNAN	NI <mark>IIF</mark> DGNNY	IS <mark>S</mark> YALREI	GL <mark>E</mark> AERIVW	AGNNVGWAAE	FALGNISDRP	IPIFDGS	AWILL-DKLSI	KNILGNFLPKNV	VNG
P.berghei	LYVTSTGKK	ISEF	DY <mark>A</mark> KENPNAN	NI <mark>IIF</mark> DGNNY	IS <mark>S</mark> YALRKI	GLENERIVW.	AGNSVGWAAE	FALGNISDRP	IPIFDGS	AWILL-DKLSI	KNILGNFLPKNV	VNG
Pyoelii	IYN	ILYL	RF <mark>G</mark> MDGSN	NI <mark>IIF</mark> DGNNY	IS <mark>S</mark> YALREI	GLENERIVW.	AGNTVGWTAE	FALGNISDRP	S			
Bbovis	IYYMDKDKK	LDEL	AF <mark>G</mark> LEAAD	FVVRAHLL	TT<mark>A</mark>STLREM	GYNIGKFIW	CGYEQGWIAD	FALHNIIGNS	DVPVFNGK	YWILS-KQMKV	ADVVGKN-VRIP	KHG
Tparva	IVYQINTGNGEGA	SIVMSER	KF <mark>A</mark> LEYP	-NFIIRAHVL	IT <mark>A</mark> KALMRM	GFDMGRVIW	CGDKYGWVAD	FSLDNIVPVS	DVPVYNGQ	YWLLT-SQLTV	KDVVGNVPIRLV	VDKKS
Tannulata	IVYQINTGGGDGA	SIVMSER	KF <mark>A</mark> LEYP	-NFIIRAHVL	IT <mark>AKA</mark> LMRM	GFDMGRVVW	CGDKYGWVAD	FSLENIVPVS	DVPVYNGQ	YWLLT-SQLTV	KDVVGNVPIRII	LDRNSRS
Tgondii	MSCDGPHEPIRVM	SWKQNHFTTF	AS <mark>S</mark> STNAERN	YVLVKKGDD	SHCWATREA	LV <mark>H</mark> KGWSGI	PVYQYAEPAG	FWLQEVSPSN	QPFVVNWD	GYLTTSDNLTL	QDIDINASSDSI	LKS
Neospora	MSCNGPHEPIRVM	TWRQNRFTTF	SS <mark>S</mark> STNAERS	SY <mark>VLV</mark> DKSEES	SH <mark>CWA</mark> TRDA	LL <mark>H</mark> KGWTGL	PVYQYEEPSG	FWLEDIVRGN	APGNGFVVNWD	NYLTTNGNLTL	QDIDPSASSQRI	LSS
	:	•	•	.:.	. :		:	* * :				
	2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140		

P.falciparum	NSLANT	VNFVILNKDO	KPILKNTTPV	INLKYATFTI	S	GIVNFV	KAEKGIGNE	IIVHTRIP			
P.vivax	SLLAST	VNFIILNKE	GRQILKNTTPV	VSLKHATFTI	S	GILNFV	RAEKGKGNEI	IIVHTRIP			
P.knowlesi	SLLAST	VNFIILNKEG	GRQILKNTTPV	VSLKHATFTI	S	GILNFV	RAEKGKGNEI	IIVYTRIP			
P.chaubaudi	NLLAKI	DINFTILNKDO	KAILKNTMPI	VNLKNATFTI	S	GVLNFV	KAEKGNDNEI	IIVHTRIP			
P.berghei	NLLAKI	DINFILNKDO	KAILKNTMPI	VNLKNATFTI	SN	GILNFV	KAEKGNDNEI	IIVHTRIP			
Pyoelii		-NYTFMKD									
Bbovis	EKIMDQNASI	VNVKVIAGDO	SKEIAKYPATK	PGQPNFDKQC	GSN	INFTLDTGYGI	EVSPAAVQDLI	IRDAEFDEATI	NTLVLNLDAPS	SIVLMESPIVS	NTTEEKPTE
Tparva	YMDTGSTDI	IDDKGLNEIN	VEIISNGKKV	GEVKSHKGET	LEGEDEEGME	EFLVGAGGDNI	SATPGAVKT	VKTATYNPTTI	HGLTLDLDMPI	DFINM	
Tannulata											
Tannataca	YVDNSTADSS	SVDEKGLNEIT	VEIISSGKKV	GEMKPHKGEA	AV-GEDEEALE	EILVGAGGENI	SATPGAVKT	VKTATYNPGTI	HGLTLDLDMPI	DFINV	
Tgondii	YVDNSTADSS	SVDEKGLNEIJ -HAVMRIVDSN	VEIISSGKKV IGKTIYQGPPI	GEMKPHKGEA GVVQTQGGVV	AV-GEDEEALE /T	EILVGAGGENI	SATPGAVKTV SGVHSTGDSV	/KTATYNPGTI /EVRVTASGP(HGLTLDLDMPI OLTSVADLDT(DFINV QFKEIPDL	
Tgondii Neospora	YVDNSTADSS	VDEKGLNEI HAVMRIVDSN FATMRITDSN	VEIISSGKKV IGKTIYQGPPI IGKVIYQGPPI	GEMKPHKGE# GVVQTQGGV\ GVVQTQGGR\	AV-GEDEEALE /T /T	EILVGAGGENI LGSIRNLV LGSIRNLV	LSATPGAVKTV /SGVHSTGDSV /SGVQTRGDNV	VKTATYNPGTI VEVRVTASGP VEVRVNAAGP	HGLTLDLDMPI QLTSVADLDT(QLTSVSDLDAH	DFINV QFKEIPDL RFKDIPDL	

Alineamiento de secuencias homólogas en diferentes géneros y especies del filo Apicomplexa.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
PfRON2	MLKFFIFILHIYLY	IDSIYSSELS	SKHVKHDTDELI	KYASPTYDP	KKGTKVIFYMI	PGNEQGVIPN	NIQNKQHGTS	IYPAIEYPTT	KYPAIEYPGSE	MNNGKTGTTI	SGIYNKAHG-	S
PfRON3	MNKYWLYIAYVYLL	LNILSKCNK	ENNNNKVKNL	rvynndigQ	YFKKKDIQCKH	HIEINQD <mark>S</mark> N	HNEYSFLSLK	ASSIFNQ	YYVAKI	INTLLYRGF	LNVYFHKNVA	MYESFS
PfRON4	-MSSVRFFLCIFLV	LFTFIDIVK	PFKGNYGEANF	SFFQATPAS	HIEEPQ-KTES	STDAQSNI <mark>T</mark> Q	NEEINNTKPL	QENITNN	QQNSNE	QQNNNEQQNI	NIEQQNNN	
PfRON5	MLKYTL	LIYIIAGYFI	[SEI <mark>S</mark> NKLFDT]	LLPRNVFKK	PKPFKKNEIK	KGIDKDEK <mark>S</mark> I	MKNVDSIDVM	FEPRVKR	FVPSR1	RKTHVVGGL	SQSISDPG	
PfRON6	MQYFF	LVFLAVLAK	GFLRNKEHANL	INSYNDIVE	DINIKK-EEKS	SSSEPPFI <mark>P</mark> I	KNKI DNVHTKI	NNNQYN	LHNNKS	NKTHLTYGTI	HTSFLQNC	
	:	: :	. :				:.	:		:.		
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
PfRON2	SND		-YNASNSQDKT	INLHIDENN	SNNSYQPYI)SNNTN <mark>N</mark> NTN	SNNNSNNSN	NNSNNNSNNY	SNNNSNTNSN7	NSNTNSNNN	TTN-YDL <mark>N</mark> SEY	E <mark>K</mark> IRRK
PfRON3	RTNFFFYLTILNKK	NVKKIVKIIS	SKAER <mark>S</mark> SNKRKI	FNVFKKYLI	SEFDYPNFEII	DDTVKNEMNQ	AILVY <mark>K</mark> KAK <mark>S</mark> I	DSYWSVMDAL	KKDGLLLARTE	LSVSFVQSLI	RGIIGLI <mark>N</mark> HKL	IDLCFT
PfRON4			IQQNNIDTS	ISHVPN		DTIKNPI	DNSNISNLDK	SNDTNNVIKH	EENNQTKENNI	ETIKHTEPLY	rnQ <mark>n</mark> tne	V <mark>K</mark> INDH
PfRON5			-DVEKSKYEKA	VRFFEN		IKNEMIN	MSSKINKQLD	SQDISSLNNF	KRASEVLKESI	ATMHSLDII	RNDGS	VDFSKY
PfRON6			TINDCV	V	I	DVDNKDSE	INNITKEKDD	NNNN <mark>N</mark> GTKQI	EEKNKINKSDI	HRQNELNLQS	SGK N EQD	INKNEK
				•		:	.:		••••	:	*	•
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
			1	1		1				1		1
PfRON2	DYTNGINNNMHGKN	NYNTA <mark>N</mark> GEYV	/NGAYDGLNNG	SYKLIĠNLN	NNQNVDNSYNQ	OGNEND KTYT	SNYNINLEDN	KNSP <mark>DN</mark> NQNY	ISTFNKDIGPN	KSE		-R
PfRON3	NVSEHLNGKNVYPI	LNNLFEKNLO	GTGFFDFSN <mark>S</mark> LI	FKYVMNYLE	EINLLNAKSVI	OVEKELILNR	HNFKLLKIL	KITK <mark>KS</mark> LLYE	ESYMKISVANI	LTKFYTLIL	VNIEHISKLNP	KEHFYN
PfRON4	HTTNHPIESHTGEN	NHDKI <mark>N</mark> EPII	PIEHATTPTNEI	PIPIEHAAT	PTNEPIPIEHA	AATP	TNEPIHIEHVA	ATPANEPTHS				
PfRON5	FITENLNASKLLKL	YDDSANDYVS	SPMHTDVCG <mark>Q</mark> L(GSIILSYMF	EKAYKSSINHI	DIS	Y-FQKYLPRL	KYRI <mark>QN</mark> MIQK	GTLLLEKG			
PfRON6	EENKKSDDHKIEEV	KKVEE <mark>H</mark> EEDI	EEEDKKEKK <mark>S</mark> EI	NKNKDENKD	ENDEDNDEISI	DED	-EVDDDVEEDI	KNEN <mark>DD</mark> IDDD				
	.:						:					
	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
PfRON2	SYYDVYGREYD <mark>DN</mark> K	YNPYN <mark>K</mark> TNNI	INTNQ <mark>N</mark> GSTTY(GSNANGTYG	PNGTYGSNGTY	YEPNESYGPN	GAYGPNGTYGI	HNGKYGSKGT	YGNNETPYYVE	HPEYDNGKSN	ISDFHVKDSKD	NIGPGG
PfRON3	DLDNEFKHIYQ <mark>DQ</mark> M	FELFI <mark>Q</mark> KISS	SDIVR <mark>K</mark> PFIKR		NIGRIDKO	GSIELTLALI	KVKLLHYKPT	LNNPYSSLYF	DE <mark>N</mark> LKKQLNYA	FKLIIIGSTS	SIIASLANYG <mark>E</mark>	RYGVLK
PfRON4	EHA	TTTTNEPIHI	EHAATPTN					-EHIHNEHAT	TTTNEPTHN		EHAATIT <mark>H</mark>	EPTHNE
PfRON5	LDDS	LYTFK <mark>S</mark> KIS-	-DIMEKKFG]	FNDMCTDKCM	DETIKADY		DLSEYKN	EF
PfRON6	KKET	DKTHLEEEE	NEIIE <mark>K</mark> EFS					-DKKKNGKNK	DT <mark>K</mark> KEKSK		DTE <mark>K</mark>	ЕК
			: .					:	. :			

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720
PfRON2	DYPNLYONTYGNE	 KNPNTFPGSP	 RNTNVYSVHH	 TPNNGANGGI,	 NSGANGGI.NN	 GANDGI.NNGA	 NGGLNNGANG(TINNGANGGIJ	 NNGMN <mark>N</mark> GMNN	 GMNNGMNNGMI	 NNGMNNGMNNG	TNGGLN
PfRON3	OCPLDIVKNLNOO(CEYVSFEIKK	LIFPINIFVN	LLIPLFL	PYD	DVLVDKNIID	EVKKFFNVIII	OTDDSYLOKY	MKTTINTIRK	SKDLDINNVN	YEEEMEKIVVO	DEAHKVI
PfRON4	HTTTPTNEPIHNE	HATTPTNEPI	PIEHIATPAN	EP	THN				-EHATTTNE	PTHNEHTTTP	TNEPIHN	
PfRON5	S-PSKTAORRADLV	VKLLMYYYRD	KIYNIETSAD	VVLIMLL	YLN				SANELSE	KGYLDVSSIS	TDDEFN	
PfRON6	SKDIEKEKSKDI	KEKEKSKDKE	KEKGKDK-EK		EKS				KDIEK	EKEKDKD-IE	KEKSKD	
									. :		: .	
	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840
	150	/40	/ 50	/00	,,,,	/00	/ 50	000	010	020	050	040
PfRON2		SMNNGTHODI.	VNSENSTENN	GLNNSGRTGL	I NNAVPHNGMLI		GNSDSNNTNDS	SMT.NENYVSD:	ן אסקא <mark>ת</mark> מעס	KKKVVKSVAFI	RNKKSASODSI	GAGESD
PfRON3	EETNKERRASEKE(ODEAAKEDSA	VLVNKSGTOV	SEKEDHLNRK	EDEMRITGSV	OFKNPIGYOT	SOLVEEPONNE	HIGSLMVGSN	KNTFDGKLSV	CHMCYKEDD	ST.VVDATESTI	WSSGID
PFRON4	EHATTPTNEPIPI	EHTATP		ANE	ΟΓΗΝΕΗ ΔΥΥΥΥ	ΟΙ ΚΝΙ ΙΟΙΟΙ ΓΝΕΡΤΗΝΕΗΔ	ͲͲͲͲΝΕΡͲ <mark>Η</mark> ΝΙ	ΞΗΔͲͲͲͲΝΕΡ	THNEH		STHN	
DFRON5				IKK	ΚΨΈΈΚΤΔΡΈΝ.	FFFFFTOFKT	CNESTEATODI	TTKTSTTAKK	SONVN		DT	WN
PfRON6		EKEKS		KD	MERI'KNROND.	EKKKDDNEKK	KNDKODTHDDI		EENDD	EEDEI	D======= DE ===== ===============================	
TIKONO				KD		•						
	•					•	••	•	• •			
	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960
				1			1	1	1			1
PfRON2	SDSDSEYEVVDGEN	NKKYKKKNKE	NNEKDKYENN	WDSNNYNSDN	EIKDGYLSES	EREYARN <mark>K</mark> AN	EIEDKMKKGEY	YSRKYKNSKS	NESGYASKQT	SDSDDSDIEA	NAFYVDNGQEN	ILIKEK <mark>E</mark>
PfRON3	RFSAFIFASFIGA	VKQTYHQGTS	WKRALSNMAP	TEFYEMHKIF	MDKSVYGKE <mark>K</mark>	SQNYFLKNIR	KYRFQFSRG <mark>S</mark> I	F <mark>SRMFRTFLE</mark>	NSLNKINFFN	SE	EAIIILVMSTI	LYALYK <mark>N</mark>
PfRON4	EH	HATTTTNEPT	HNEHS		TT	PTNESTHSEN	ATTSTNEOHS	HDONTEVHPN	DKLALVPFOG	I	KNPIPSNESO	PIISFPN
PfRON5	01	IONMYSASYG	FVOSK		KI <mark>K</mark> '	TNKFVGS <mark>KIR</mark>	NVGFLLRWFN	YNKTPSKNIN	FLVNNFSPLV	SI		1IEOYE <mark>S</mark>
PfRON6	D	MENKKKKKKG	KNGNE		N	GNENGSENGN	ENGNENGNEN	ENKNESENEN	ENENENENGN]	 EN	ENEKE
						: .		.: .			•	
	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
PfRON2	HYSS <mark>DSE</mark> HHKEESA	ASIGNLN	VFFPAEN	YHFSTYMGFD	RR <mark>SF</mark> LPSNEI	ELEKMIGANF	SNEVKNYCSRÇ	2NVAQKIGDY:	LNISFEYSRA	LEELRSEMIL	DFNKRKHLTNN	TDDTIL
PfRON3	IEKFDIPLKETY	Y <mark>K</mark> LYQQKLIE	SYYHVDKYSH	HYETYTLNIR	RK <mark>KY</mark> NALVKS	EHEKAQEASQ	GEGKDEAENAI	ELKKRVEKRI	NFNDIQLTME	DEVVR <mark>N</mark> TKYL	QLELQAKPQ	-EREKII
PfRON4	EDDNHAQNEC	G <mark>S</mark> IN		APS	EGEHNNTDN-				KEGP <mark>I</mark> ITPLE	GEQAG <mark>T</mark>		A
PfRON5	SFLG <mark>NFS</mark> SALKKII	FTLGK	S	GRN	PRNYNDLVN-				-FSEVDYLLR	TSKANN		-VQRIIM
PfRON6	NEKDKNIKEIH	E <mark>N</mark> VT		NAN	KENYEKINK-				-NSEITITKS	NIDIY <mark>N</mark>		N
	::	.:			:				•	•		
	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
				1					1	1	1	1
Pfron2	HMIENAEKRKNDPI	NYKEAYĖNKD	YANNANI	FMNEYSNPLS	TKYNKILKEY	LCHLFVNNPG	TKPLERLYYNS	SLALGELVEP	IRNKFKSLAS	STIDFNYEIH	MASASNIYI	LAHFLV
PfRON3	QYLTYKY <mark>KE</mark> IPNHI	EMFPHLPHOC	YFLLYYNYEP	FLEKNLHGLE	GVVSKITRKS'	VLSRYLKNIN	LIQPEKTRFAS	SIKLKDLINI	LCGTHMFLKK	EHITFDEIYK	YENSNDALKHI	LIIVAL
PfRON4	HKEDVTHKHMVGE	HVPPQKTHHG	PIITPVG	GNHVPPOT	HHAHIITPVG	GEHAHGQGNN	DTTYVTMNTDE	ESSSSDTKGE	HSNLRS	YNKNMNNHA	QRD	
PfRON5	QIIRMLK <mark>KK</mark> FL <mark>S</mark> SS	- SYTPTLLAOY	MSIFLS	LWVFEGEN	NISL-ONP	NISRFKKIFF	LTYFVHEKGPV	VEKAVDIIYN	KCRMKT	DKIVLGCIHD	YG	
PfRON6	NRN-NDIDKVNNH	IFT-N		QQKKHNLH	NEQN	KFNETLN	VSTNHKNHYE	EKKKYESNMF	NVDKRMHK	NLTSMDTILH	NLN	
	· · · · ·				_			:	: .	:.		

	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
PfRON2 PfRON3	 LSLAYLSYNEYFT LRIEKRTNRYSWT	 TGTKSFYSLP TYLTLQKQLD	 TILTANSDNSI ERKRYYDTPFI	 FFMLNEMCNI KYLFLKISKV	 HYNPNKNF <mark>KK</mark> RRFYGSAK <mark>KK</mark>	 DITFIPI <mark>E</mark> SI MLLGFGK <mark>K</mark> FI	 RPKRTTTFYGEF KGVRFLNILRY1	 RR [RFFEIMEYA	 LTCDLL] SINEFYPYC	 ELVLNAIMLII YIKFEDVLTF;	 NIN] SNVFYKFKYS]	EINNVFS LLRYTTS
PfRON4					QYD <mark>SD</mark>	TLNSEGSDDA	AYSSMQQN					FE
PfRON5					GREK <mark>KK</mark>	LLGLISR <mark>K</mark> CI	KPTKIS					IR
PfRON6					DK	LSHHKDL <mark>K</mark> NI	RELKLK					
					••	•						
	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
PfRON2	NNVDGYENSLSF	SHNAIRİFSK	VCPKINNDNVI	LKCEFEESSL	YNPKIIKNDT	SEKSSQKNLI	KKAFDLLRTYAE	EIEGHSÄEGS	TSPYYVSLILI	DDMKYNDFYK	YTLWYEPREL	IYG
Pfron3	KQSVRNVVNNFNL	SPQTTGNNEN	LLLRIYRFIEI	LIIKKKYN	VDIQHVRK	DDKDFNRHA	YNKNEYILNDI	KFNPNIEQYL	RQLTGFIKLL	DMKFTNFLF:	LRNLYYFVKF	YAVTGDL
PfRON4	KNGIDSFKGKGLH	VSLRERIIIE	IMESAKNGIDO	GLL <mark>K</mark> LKD	SK	DSGKLFMEA1	LEKLNINMKDLF	KKD				
PfRON5	KR SIRKILNKLMS	SLNDPVDILR	IAVDTATRCD	HFNRSKN	IDNVKT	KKNKINYEI	FVKSELSIRYIC	CAD			V	
PfRON6	FEAMSRIKEYKIY	NELIQKSVEI	LTLRLTKINDE	ELK <mark>K</mark> LKD	I	SENALQKYI1	NEKGYGLMKHYN	NFP				
	. :		:	. :		••						
	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
PfRON2	DIRGMQMKK	KKKTKYIYN <mark>D</mark>	FMKKSTQLKKI	KLIKNDLKYN	LKSKGLVFLY	AMIDKYGSI	LNKSQKAKVQFI	LNSTSSIRYY	LYLNKVIFKS	AKTYLDIMKR	VLEELQTSTN	TPLKFLV
PfRON3	TYSINNSSIYLCS	RNYLEFILNS	IIEFENFKKFN	IVKIKEKFDI	EKYPIDPYNF	QTECYSIDS	VKTYRFFLSDLI	OKLKSYQDIE	NLQNVSSFYKI	DYLYMGLFYE	NLDVRNLNV-	
PfRON4	К	NLISLEVYD <mark>K</mark>	ILSTMFKILTE	EMSFYED						SKFYETLG		
PfRON5	T	KNVVKKIIRD	V SRLKNMREAÇ	2N-VIDN	GL	NSVQYLK	IR	NYRDKE	S	SFTILCPFME		
PfRON6		EYNK	LEEEKIMKRSH	KITWNEK					K	SHHLYCPMEC		
		•	•	:								
	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
PERON2	RGNYLENINNIAR	NDNMF'YANLF'	VL'I'ALS-RRDI	PVKDYYNDKR	KMLSATLAEK	FANSTSMLI	PHKLRKLVVSMP	KGLLKKKLL	'TSLAKVKLLQI	HIPAHMLENI	ISSIRFTTHT.	LATMQII
PERON3	YYNFNKKKNQ	DHKAHGSNVF	LDGGLSLSKNN	ASFSDINDLS	ESIQNYLYLE	KFLADSNIP:	SIPYQGFSVRRV	/NDGMHVTYN	INRST PPLYKI	DNVLDQFELV	GKSLISEYFQ	KVKCSFI
PIRON4	IKKDIL	NQSLKDIKIK	MLRKLGVSYSI	KLPPIIKHTE	GKCAIKDIII	SISSKE		LAQRM		DEYGAVVDYE.	NNVELNVLCS	GAPILIQ
PIRON5	GNDKNIR	ELERTQISLF	IHKNIGMSRI		KTLNMRE	GIKSDS		AISIKVG	ARKYNGIIF'T'	GYQLNVDNL.	DQNTLHIGLS	KTRKVYD
PIRON6	NKERCY	NRPRGPTQCY	KLEQIGRN-	IETIC	EDEIN				EHNGTCRPI	DFHHCALAEP.	ERNKKYSIYA	I'DDVHF'V
		• •	•••						•	•		
	1600	1700	1710	1720	1720	1740	1750	1760	1770	1700	1700	1000
	1090	1700	1/10	1720	1/30	1/40	1/50	1/60	1770	1/80	1/90	1800
DEDON2					VCEEEVVDEO	TENERMENC				 EDEKN	KRENCT ENO	
PIRONZ DEDON2		NDCKDNICIC	IFTKGGFAEIA	ADNLMAKWF 5	KGFEEIKKEU	LENFEMENS.	IDSELKDSEREI			EREKM	KKENSLLFNU	
FIRONS DEDONA		MEGVENTOPP	ON TOLINEDUI	JIEVIAERT SU	NEGGENUIKI	VENTEREDII	FUFRURBUUUUUS		I DOSETDAEK.			
FIRON4	C DRANDELETIR ÖMVIIÖNLPILA	CDCURNITAMA DUDUVITAMA	ст и Ст и	עי די			TARCIAIMAIG-	JANTTVEDON	ı————————— r			
DEDUNG	G-KKIVDELEILK	UFCI OFI WW		<u>-</u>		EKN	PDIALQ-NPD	-ANIIVEDGN _TMECE		<u>-</u> Nit22		
LIKONO	- SOLATIVENT	•	MN9		ICGFHII	•••		-uriese	,	<u>-</u> стрке.	е v цо	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	•	•				••				•		•••

	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920
PfRON2	 INKELVRALGLWL	 EFNDNPTNAS	 	 VYKVVE <mark>D</mark> SKI	 HLLENNIDNN]	 [IFSRTVKPT]	 KOTAFRRFFNK	 ILSLGNMLLR	 KP <mark>S</mark> FRVEHAL	 WFGATIDIKK	 AFILLEKVSE	LHKMLNN
PfRON3	NRQNDVSKNTTYA	ENNEYTSENI	TKPSDQNTEN	IYGTKMP <mark>S</mark> PSI	FIQIDK <mark>V</mark> NQQI	QQNDAHIES	SKNTQENLN	YDDNTNMYEE	NKNDKKNKKL	NNNTKEISFI	ERRETNPIPF	SSNMINE
PfRON4	IKANIS	TYYKATAQRI	NSYF	HYTEKK <mark>S</mark> KKS	SPLKIISVC	TLLHLTDMLY	CSDEN	SNGVMD	LY <mark>N</mark> LQLN			
PfRON5	VWAGPSVGWT	AEFALSAI	SDN	IPLPIFD <mark>G</mark> SAV	<i>VLLEKLSIRS</i>	SILG-KHLPS	OVNGNS	LANTVNFVIL	NKDGK			
PfRON6	LFEN	IKI	S	TPGEYN	NICLAQ <mark>F</mark> YQDI	PEKDDILS	ENSSNK	ҮКК	KKKND			
			•	•	•		•••		•			
	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040
DEDONO												
PIRONZ DEPON3	QDESWLINEAFIE KNKENHKEHVCNE	TADHAADT2.1	YKHVREPFGV	ARNPGMMAIN	NERNAELSHEI	NRLRELQNSMO	ZADHCSSVWKV	ISSFALHHLK	NPDSLHTYES	KFSKNSFGNK	IDDKDFVHNF	KMILGGD
PIRON3 PFRON4			TT.NMKGKMVT	OVI.VHI.KFI.1	TOE			KKNO		ETCEPONG		
PfRON5	P		ILKNTTPV	INLKYATFTI	S			GIVN	FV	IKAEKGIG		NE
PfRON6			MKVLGI	D-TIGTLYVI	P			LHEK		QKT <mark>G</mark>		
			:							*		
	2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160
DFDON2	א <i>זו</i> ד שעדים און דסעיד	 אעאחד אאאעע	 					סד עד דאפידאיי סד עד דאפידאיי	 נכפז פאעיד ד	 אגרוסייד תאג פי		<u>-</u> <u>-</u> <u>-</u> <u>-</u> <u>-</u> <u>-</u> <u>-</u> <u>-</u>
PFRON3	OLENOVITVPPLK	RI TKKEI KYI	T.DVVNOGYYF	ALTKINALLROOL	RENTORSKVI	/KTENNEOEES		LYNTFTETFK(CKNIKCFDLI	FOGFLTEOYN	INTVYRYTHDH	DAMNSYN
PfRON4	ETLTKMLILLS		TDSHEI	LSHELENKG	DEDYIODEI	NINESDNNI	RDKEEDDAEKM	IFDDL				
PfRON5	IIVHTRIP											
PfRON6												
	2170	2180	2100	2200	2210	2220	2220	2240	2250	2260	2270	2280
	2170	2100	2190	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2200	2270	2280
PfRON2	POOICLNSVVNTA	LSTSTOSAME	CVFSVGLFAS	SIGPYLFAPM	GLAVWNILKS	SEFKVLORID	ALKNVFKNMW	NKFLSLKGIS	KLRGIFKRKK		TRKMNDMKNN	PEKAKAH
PfRON3	DNIFNNKELLNKI	FRR	A	YDNYFITPV	KNNQPKKLISI	LEKPSLEQPVI	LTLEEFAYGFH	EFGNKIEKWR	SMLTLFN	-IRHIYINIC	HMLLSVKHSI	QRSHRVF
PfRON4												
PfRON5												
PfRON6												
	2290	2300										
DFDON2			ът									
PIRON2 DFRON3	MHKEGEEGIEBBK	PETVID	.KI									
PfRON4												
PfRON5												
PfRON6												

Árboles filogenéticos de aminoácidos de la proteína PfRON5 y proteínas homólogas encontradas, utilizando los siguientes parámetros:



D. Método: Mínima evolución Test de filogenia: 1000 replicaciones bootstrap Gaps: Complete deletion Modelo de sustitución: corrección Poisson.



E. Método: Máxima parsimonia Test de filogenia: 1000 replicaciones bootstrap Gaps: Incluyendo todos los sitios Modelo de sustitución: corrección Poisson.



F. Método: Máxima parsimonia Test de filogenia: 1000 replicaciones bootstrap Gaps: Complete deletion Modelo de sustitución: corrección Poisson.



Árboles filogenéticos reconstruidos con el marcador filogenético 18S rRNA:

A. Árbol filogenético del género *Plasmodium* reconstruido por el método de Máxima probabilidad. Se muestra una asociación similar a la presentada por el árbol reconstruido con la secuencias la proteína RON5: *P. vivax* relacionado con *P. knowlesi* (verde), y en el mismo clado *P. yoelii* y *P. berghei* (azul). El circulo rojo muestra una rama interna con bajo valor de bootstrap, este valor fue computado para los métodos máxima probabilidad, máxima parsimonia y Neiborg Joining. Tomado de: (Nishimoto et al., 2008).



B. Segmento de un árbol filogenético del filo *Apicomplexa* reconstruido por métodos Bayesianos. Las flechas muestran una asociación similar a la presentada por el árbol reconstruido con la secuencias la proteína RON5: *Babesia* en el mismo clado con *Theileria*, y *Neospora* con *Toxoplasma* altamente relacionados. Tomado de: (Morrison, 2009).



ANEXO 6

Alineamiento de los dominios transmembranales (TMs) conservados (resaltados en amarillo), predichos por Polyphobius en diferentes géneros del filo *Apicomplexa* y especies de *Plasmodium*.

Dominio 1, se encuentra conservado en los siguientes ortólogos:

P. falciparum551-LVNNFSPLVSISLQLVFFITTMI-573P. vivax551-LVHNFSPLLSVSLQLTFFISTMI-573P. knowlesi552-LVHNFSPLISVSLQLTFFISTMI-574P. chaubaudi547-LVKNYSPLASLSLQLTFFINTMI-569B. bovis890-MPKQFLPFTSLVLQICFFIEDAV-912

Dominio 2, se encuentra conservado en los siguientes ortólogos:

54
ΰ 5
ΰ 5
<u>50</u>
)4
16
04
46
106

Formato de salida de la predicción de la estructura secundaria por SOPMA. En amarillo se resaltan los dominios transmembranales predichos por la Polyphobius y se observa que la predicción de la estructura secundaria de estos dominios corresponden a hélices alfa (h).

10	20) 30	40) 50) 60	70
MLKYTLLIYI	IAGYFISEIS	NKLFDTLLPR	NVFKKPKPF	KKNEIKKGIDI	KDEKSIMKNVD	SIDVMFEPRV
hhhheeeehh	hhtccchhhh	hhhhhh <mark>cc</mark> c	ccccccccc	hhhhtccch	հիհիհիհի	heeeecttc
KRFVPSRTRK	THVVGGLSQS	SISDPGDVEKS	KYEKAVRFFE	ENIKNEMINMS	SKINKQLDSQ	DISSLNNFKR
ceecccccc	eeeeeccccc	ccccccchh	hhhhhhhhh	hhhhheeel	hhhhhh <mark>cc</mark> hh	hhhhhhhhh
ASEVLKESLA	TMHSLDIIRN	IDGSVDFSKYI	LDWYSKANMF	REKYSIEKSIÇ	OKIMNKLFKKA	RKKKKNMKKK
hhhhhhhh	hhhhhheect	tcceeeehce	hhhhhhhhh	հիհիհիհիհի	hhhhhhhhhh	tcccchhhhh
KIDANIEQLE	MDLLVQKFI	ENLNASKLLK	LYDDSANDY	/SPMHTDVCGQ	DLGSIILSYMF	'EKAYKSSINH
cchhhhhhh	hhhhhhhhh	hh <mark>cc</mark> hhhhh	hhccccccc	cccchhhhh	hhhhhhhhhh	hhhhhhhht
DISYFQKYLF	RLKYRIQNMI	QKGTLLLEK	GLDDSLYTF	KSKISDIMEKH	KFGFNDMCTDK	CMDETIKADY
thhhhhhhh	hhhhhhhhh	httceeeehh	tchhhhhhh	hhhhhhhtt	cceeeecccc	chhhhhhhh
DLSEYKNEFS	PSKTAQRRAD	DLVKLLMYYYR	DKIYNIETSA	ADVVLIMLLYI	INSANELSEKG	YLDVSSISTD
hhhhhcccc	cccccchhł	hhhhhhhhh	hhhhh <mark>ccc</mark> ł	hheeeeehhi	nccchhhhhtt	ceeeeecccc
DEFNLINKTI	DRSHKFNKKI	KIKKKTFFKI	APFNFFREED	FQEKTGNESI	FAIDDIIKTSL	LAKKSQNYNS
chhheeeeh	ctttthheee	ecccccceeee	ccccccccc	cccccchhhe	ehhhhhhhhh	hhccccchhh
LYETTKDLWN	QIQNMYSASY	GFVQSKKIKI	NKFVGSKIRN	NVGFLLRWFNY	NKTPSKNINF	'LVN <mark>NFSPLVS</mark>
hhhhhhhh		eecttccccc	cceehcchhł	hhheeeeco	ccccccc <mark>hee</mark>	eehcccccch
ISLQLVFFI1	' <mark>TMI</mark> EQYESSE	LGNFSSALKK	IFTLGKSGRN	IPRNYNDLVNI	SEVDYLLRTS	KANNVQRIIM
hhhhhhhhh	hhhhhhhhh	hhhhhhhhh	eeeecccccc	ccchhhhhh	hhhheeehcc	chhhhhhhh
QIIRMLKKKF	'L <mark>SSSYTPTLI</mark>	AQYMSIFLSI	<mark>WVF</mark> EGENNIS	SLQNPNISRFE	KIFFLTYFVH	IEKGPVEKAVD
hhhhhhhe	ccccccch	hhhhhhhhh	eeeccccee	eccccccccc	cheeeeehhhc	cccchhhhhh
IIYNKCRMKT	DKIVLGCIHI	YGGREKKKLI	GLISRKCKPT	TKISIRKRSI	RKILNKLMSSL	NDPVDILRIA
heehhccccc	ceeeeeccco	cccccc <mark>hhee</mark>	eeeccccccc	ceeeecchhhł	hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh	ccchhheeee
VDTATRCDHF	NRSKNIDNVF	TKKNKINYEI	FVKSELSIRY	ICADVTKNVV	/KKIIRDVSRL	KNMREAQNVI
hhhhhhhhc	ccccccccc	ccccccchhe	eehhhhhhh	ւհհհհհհհհ	ւհհհհհհհհ	ւ <mark>hhhhhhhhh</mark> h
DNGLNSVQYI	KIRNYRDKES	SFTILCPFME	GNDKNIRELE	ERTQISLFIHE	KNIGMSRIIKG	KLINIFKKTL
hhhhhhhhe	eecccctto	cceeechhht	.ccccchhhhł	ւհհհհհհհհ	ւհհհհհհհհ	.hhhhhhhhh <mark>c</mark>
NMREGIKSDS	AISIKVGARF	YNGIIFTGGY	QLNVDNLDQN	NTLHIGLSKT	RKVYDGRKYVD	ELEILKGDGV
cccccccc	ceeeetccc	ttteeeetco	cccccccct	eeeecccccc	ceeecccchhh	hhhhhctttc
KNIYMKGLNE	DNERIYELQN	INMRVSEFDYA	IQNPDANII	/FDGNNYISSY	ALRNMGLEHE	RIVWAGPSVG
ceeeeccco	ccceeeect	tcccchheee	eccttcceee	eettccehhl	hhhhttccht	eeeetcccc
WTAEFALSAI	SDNPLPIFDO	SAWVLLEKLS	IRSILGKHLI	PSDVNGNSLAN	ITVNFVILNKD	GKPILKNTTP
eehhhhhhco	cccccceecc	cceeeehhhh	hhhhtcccc	ccccchhhht	ceeeeectt	cceeeetccc
VINLKYATFI	LSGIVNFVI	XAEKGIGNEII	VHTRIP			
eecccccee	htthheeeee	htttccceee	eeeccc			
Sequence 1	ength : 1	156				
SOPMA :						
Alpha h	oliv (<u> א</u> ר אין דער אין ד	2 ig 47 7	758		

Alpha helix	(Hh)	:	552	ĺS	47.75%
3 ₁₀ helix	(<mark>G</mark> g)	:	0	is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0	is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0	is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	193	is	16.70%
Beta turn	(Tt)	:	54	is	4.67%
Bend region	(<mark>Ss</mark>)	:	0	is	0.00%
Random coil	(<mark>C</mark> C)	:	357	is	30.88%
Ambigous states	(?)	:	0	is	0.00%
Other states		:	0	is	0.00%

Contents lists available at ScienceDirect

Gene



journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Identification of the Plasmodium falciparum rhoptry neck protein 5 (PfRON5)

Hernando Curtidor ^{a,b,c,1}, Liliana C. Patiño ^{a,b,1}, Gabriela Arévalo-Pinzón ^{a,b}, Manuel E. Patarroyo ^{a,d}, Manuel A. Patarroyo ^{a,b,*}

^a Fundacion Instituto de Inmunologia de Colombia, Carrera 50 No. 26-20, Bogota, Colombia

^b Universidad del Rosario, Calle 14 No. 6-25, Bogota, Colombia

^c Universidad de la Sabana, Km. 7, Autopista Norte, Bogota, Colombia

^d Universidad Nacional de Colombia, Carrera 45 No. 26-85, Bogota, Colombia

ARTICLE INFO

Article history: Accepted 14 December 2010 Available online 23 December 2010

Received by Leonardo Marino-Ramirez

Keywords: Malaria Plasmodium falciparum Merozoite Erythrocyte invasion Homology

ABSTRACT

Gathering knowledge about the proteins involved in erythrocyte invasion by *Plasmodium* merozoites is the starting point for developing new strategies to control malarial disease. Many of these proteins have been studied in *Toxoplasma gondii*, where some belonging to the Moving Junction complex have been identified. This complex allows a strong interaction between host cell and parasite membranes, required for parasite invasion. In this genus, four rhoptry proteins (RON2, RON4, RON5 and RON8) and one micronemal protein (TgAMA-1) have been found as part of the complex. In *Plasmodium falciparum*, RON2 and RON4 have been characterized. In the present study, we identify PfRON5, a ~110 kDa protein which is expressed in merozoite and schizont stages of the FCB-2 strain.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Among the five parasites causing malaria in humans, *Plasmodium falciparum* is the species responsible for the highest morbidity; ~250 million cases of malaria are reported per year and a 93% of them are attributed to this parasitic species (WHO, 2009). Different strategies to eradicate this disease have been designed, such as pesticides, mosquito nets, antimalarial drugs, and different types of vaccines. However, several factors such as the global expansion of the disease (due in part to the increase of strains resistant to antimalarial drugs), the parasite's high genetic variability, the vector resistance to insecticides and the poor socioeconomic conditions of affected populations justify the search and adoption of new measures, such as the development of a fully effective vaccine (Good, 2001).

Merozoite surface proteins and some rhoptry and micronemal proteins have been considered as vaccine targets, since they are

¹ Both authors contributed equally to this work.

0378-1119/\$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.gene.2010.12.005

exposed to the immune system during the invasion of red blood cells (Cowman et al., 2002). This invasion begins with the merozoite reversible binding to the erythrocyte surface, mainly mediated by the Merozoite Surface Proteins (MSPs) (Chitnis and Blackman, 2000). Subsequently, a high affinity binding known as Tight Junction (TJ) occurs between the merozoite apical end and the erythrocyte membrane. The TJ migrates from the anterior to the posterior end of the merozoite during invasion (Moving Junction) activating the actin-myosin machinery (Alexander et al., 2005; Baum et al., 2008; Straub et al., 2009). As the parasite is moving in, the parasitophorous vacuole is formed, in which the parasite will develop and replicate for the next cell generation (Kaneko, 2007).

Recently, some authors have identified the proteins present in *Toxoplasma gondii* TJ complex (another member of the *Apicomplexa* phylum), using immunoprecipitation techniques. This TJ complex is formed by a micronemal protein, known as the apical membrane antigen 1 (AMA-1), and four rhoptry neck proteins (TgRON2, 4, 5 and 8) (Alexander et al., 2005; Baum et al., 2008; Straub et al., 2009). Besteiro and coworkers have recently proposed a model for TJ proteins organization, where TgRON2 and TgRON5 are exported to the host cell membrane, while TgRON4 and 8 are translocated to the host cell surface and TgRON2 acts as a specific receptor for TgAMA-1, which is located on the parasite membrane (Besteiro et al., 2009).

The presence of orthologous genes which encode for RON proteins in different *Apicomplexa* members suggests that the TJ complex formation is a conserved mechanism in this phylum (Proellocks et al., 2010). TgRON2 and TgRON4 homologous proteins have been



Abbreviations: AMA-1, Apical membrane antigen-1; DAPI, 4',6-Diamidino-2phenylindole; EGTA, Ethylene glycol tetraacetic acid; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; FCA, Freund's complete adjuvant; FIA, Freund's incomplete adjuvant; FITC, Fluorescein isothiocyanate; IFA, Indirect immunofluorescence assay; MSPs, Merozoite surface proteins; PBS, Phosphate buffered saline; RBC, Red blood cell; RON, Rhoptry neck protein; RP-HPLC, Reverse phase-high performance liquid chromatography; RT-PCR, Reverse transcription polymerase chain reaction; TMs, Transmembrane domains.

^{*} Corresponding author. Carrera 50 No. 26-20, Bogotá, Colombia. Fax: +57 1 4815269.

E-mail address: mapatarr.fidic@gmail.com (M.A. Patarroyo).

characterized in *Plasmodium falciparum* (Alexander et al., 2006; Cao et al., 2009; Morahan et al., 2009), but TgRON8 does not share similarity to *Plasmodium* proteins (Straub et al., 2009). Additionally, PfRON6 has been characterized in *P. falciparum*, but it is not present in the TJ complex (Proellocks et al., 2009).

Although PfRON5 has been considered as a member of the RON complex (Collins et al., 2009; Richard et al., 2010) it has not been identified yet. Here we report PfRON5 sequence, localization and expression in *P. falciparum* FCB-2 strain.

2. Materials and methods

2.1. Primary structure analysis and identification of orthologues

The MAL8P1.73 gene sequence coding for PfRON5 (Bahl et al., 2003; Collins et al., 2009) was used as a starting point for bioinformatics analyses and primer design. PfRON5 homologous sequences in Apicomplexa were obtained using BLASTP searches in NCBI and EuPath databases (Altschul et al., 1990; Aurrecoechea et al., 2007). The Polyphobius and InterProScan predictors (Kall et al., 2005; Quevillon et al., 2005) were used to search for a signal peptide. Phobius, TMpred, TMHMM, ConpredII and Polyphobius programs were used to predict the transmembrane regions (TMs) (Hofmann and Stoffel, 1993; Krogh et al., 2001; Arai et al., 2004; Kall et al., 2004, 2005). The phylogenetic relationship between the homologous sequences were assessed with Mega 4.0 software (Tamura et al., 2007) to construct trees by Neighbor-Joining, Maximum Parsimony and Minimum-Evolution methods (Cavalli-Sforza, 1967; Saitou and Nei, 1987; Nakhleh et al., 2005). Protein alignment was carried out in Clustal W software (Thompson et al., 1994).

2.2. RNA isolation and cDNA synthesis

Synchronous *in vitro* cultures of the *P. falciparum* FCB-2 strain maintained as previously described (Trager and Jenson, 1978) were used as source of RNA and proteins. RNA (5 μ L) isolated by the Trizol method (Chomczynski, 1993) was reverse-transcribed using Super-Script III (Invitrogen) and random primers in a 60 min cycle at 50 °C. The cDNA was amplified with pEXP5-F (5'-ATGTTGAAATA-CACTTTGCTCAT-3') and pEXP5-R (5'-AGGTATTCTAGTGTGTACAA-TAA-3') primers and the TAQXpediteTM enzyme (EPICENTRE Biotechnologies).

2.3. Cloning and sequencing

PCR products obtained from the cDNA amplification were purified and cloned into the pEXP5-CT/TOPO vector (Invitrogen), an additional reaction was necessary for adding adenines in the 3' region with Biolase enzyme (Bioline). The recombinant clones, confirmed by PCR and purified using Ultra Clean 6 Minute Plasmid prep (MOBIO Laboratories), were sequenced in an automatic sequencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems) using pEXP5-CT/TOPO vector primers: T7 Forward 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' and pEXP5-CT-Sec-rev 5'- CAAGGGGTTATGCTAGTTAT-3', and the following internal primers: 1R 5'- TAAAACGACATCAGCACTAG-3', 2F 5'-TCAAAAACGGCACAAAGAAG-3', 2R 5'-TATCAACGGCAATTCT-TAAAAT-3' and 3F 5'-ACAAAGATAAGTATAAGAAAAC-3' (Fig. 1).

2.4. Antibodies

Polymeric peptides were used for rabbit immunization to obtain anti-PfRON5 polyclonal antibodies. Two New Zealand rabbits (69 and 73, previously determined to be nonreactive to *P. falciparum* lysate by Western blotting) were injected with a mixture made up of three peptides: CG-33-FKKPKPFKKNEIKKGIDKDE-52-GC (peptide 36924), CG-348-ADYDLSEYKNEFSPSKTAQR-367-GC (peptide 36923) and CG-776- RCDHFNRSKNIDNVKTKKNK-795-GC (peptide 36926), which were predicted to be B epitopes using ANTHEPROT and BepiPred tools (Deleage et al., 2001; Larsen et al., 2006). Peptides were synthesized using the t-Boc/Bzl solid-phase synthesis (Merrifield, 1963; Houghten, 1985), lyophilized and characterized by RP-HPLC and MALDI-TOF MS. Glycine and cysteine residues were added to the N and C termini to allow polymerization. The peptide mixture was inoculated (250 µg per peptide) intramuscularly emulsified in Freund's complete adjuvant (FCA) (Sigma) for the first dose. The rabbits received two additional doses of this mixture, emulsified in Freund's incomplete adjuvant (FIA) (Sigma) on days 20 and 40. Sera were collected before the first immunization (pre-immune), and 20 days after each immunization (post-first, post-second and hyperimmune, respectively).

2.5. Rabbit sera adsorption to sepharose coupled to either Escherichia coli sonicate, RBC lysate or SPf66

Escherichia coli (DH5a strain) protein sonicate was obtained from an overnight culture in Luria-Bertani medium, then washed, resuspended, sonicated in an Ultrasonic Homogenizer (Cole Parmer) for 2 min at 4 °C, and spun for 10 min at 4,500 g and the supernatant was resuspended in coupling buffer (1.0 M NaHCO3, 0.5 M NaCl, pH 8.3). Rabbit RBCs (60%) were lysed with saponin (Sigma) (0.2%) and resuspended in coupling buffer. The suspended lysate, sonicate and synthetic SPf66 peptide vaccine (Patarroyo et al., 1987, 1988) were collected and used individually for coupling to CNBr-activated Sepharose 4B (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's recommendations. Rabbit sera (pre-immune and immune) were preadsorbed to *Escherichia coli*, rabbit RBC and SPf66 Sepharose affinity columns to eliminate nonspecific cross-reactivities, as previously described (Curtidor et al., 2008).



Fig. 1. Schematic representation of PfRON5. A. Genomic DNA, which consists of 31 exons, followed by a diagram of the transcript where primers used for sequencing are shown with arrows (details in the text). B. Schematic representation of the PfRON5 protein. Grey bars indicate the localization of the peptides synthesized for rabbit immunization. SP indicates the signal peptide.

2.6. Recognition of inoculated peptides

For the ELISA test, 96-well plates (Nunc) coated with 10 µg/mL of each peptide (36924, 36923 and 36926) were incubated at 37 °C for 1 h, left overnight at 4 °C, and incubated at 37 °C for an additional hour. Plates were washed five times with PBS-Tween 0.05% and incubated with 0.5% skimmed milk diluted in PBS-Tween 0.05% for 1 h at room temperature. A 1:100 sera dilution collected from immunized rabbits (69 and 73) was added by duplicate. Plates were incubated for 1 h at 37 °C and washed five times with PBS-Tween 0.05% to remove excess of unbound antibody. Wells were then loaded with 100 µL of peroxidase-coupled goat anti-rabbit IgG antibody (Vector Laboratories) diluted 1:5000 and incubated for 1 h at 37 °C. Excess of unbound antibody was removed by washing wells thrice with PBS-Tween 0.05% and immunoreactivity was revealed by using the TMB Micro-well Peroxidase Substrate System kit (KPL Laboratories), according to the manufacturer's instructions. Absorbances were read at 620 nm in an ELISA reader (Lab Systems Multiskan MS).

2.7. SDS-PAGE and Western blot analysis

Protein lysates from *P. falciparum* (FCB-2) infected RBC rings (4–8 h), early trophozoites (19–24 h), late trophozoites (26–31 h), schizonts (42–47) and free merozoites (Mz) were obtained using saponin (Sigma) (0.2%) and lysis buffer (100 mM PMSF, 20% SDS, 0.5 M EDTA pH 8.3, 100 mM iodoacetamide) and then separated by SDS-PAGE using a 5% (w/v) polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Trans-Blot, Bio-Rad) using the semidry blotting technique. All samples were separated under denaturing conditions. For Western blot analysis, the nitrocellulose membrane was blocked using 5% skimmed milk diluted in Tris-buffered saline with 0.05% Tween (TBS-T) and washed thrice with TBS-T.

Pre-immune and immune preadsorbed serum samples were diluted 1:40 in blocking solution and incubated individually with membrane strips. After five washes with TBS-T, strips were incubated for 1 h with a 1:5000 alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (ICN Biomedicals). The reaction was detected using NBT/ BCIP (Promega).

2.8. Indirect immunofluorescence assay (IFA)

Blood smears from parasite culture with 5% parasitemia (mature schizonts) were used for IFA, fixed with 4% formaldehyde, permeated with 0.1% Triton X-100 (Sigma) in PBS and blocked with PBS–BSA 1% for 30 min at 37 °C. Preadsorbed rabbit polyclonal sera directed against the mixture of the three synthetic peptides were used as primary antibody at a 1:40 dilution in PBS–BSA 1%. Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) was used as secondary antibody at a 1:30 dilution in PBS–BSA 1%, followed by the addition of DAPI (Sigma) 2 μ g/mL. The smears were analyzed with an Olympus BX51 fluorescence microscope using an Olympus DP2 camera and Volocity software (Perkin Elmer).

3. Results

3.1. PfRON5 sequence analysis

The MAL8P1.73 gene coding for *Pf*RON5 is located in chromosome 8 and has a length of ~7669 bp with 31 predicted exons (Fig. 1) (Wheelan et al., 2001; Gardner et al., 2002; Bahl et al., 2003). The signal peptide was here predicted using Polyphobius (aa 1–19) (Kall et al., 2005) and InterProScan (aa 1–21) (Quevillon et al., 2005) web servers. Richard and coworkers had predicted six transmembrane regions (TMs) for the hypothetical protein based on a hydrophobicity profile analysis (Richard et al., 2010). Several bioinformatics tools were here used aiming at building a consensus on the number of these

regions. However, results obtained from the predictors used are quite different, ranging from 0 to 5 TMs (Table 1).

The sequence of MAL8P1.73 was used as a BLASTP query in NCBI and EuPath databases (Altschul et al., 1990; Aurrecoechea et al., 2007). We found RON5 orthologues in P. vivax Sal-1 strain (PVX_089530, PlasmoDB), P. knowlesi H strain (PKH_051420, PlasmoDB), P. berghei ANKA strain (PBANKA_071310, PlasmoDB), P. yoelii 17XNL strain (PY02282, PlasmoDB), P. chabaudii (PCHAS_072220, PlasmoDB), Babesia bovis (XP_001611063.1, NCBI), Theileria annulata (XP_953613.1, NCBI), Theileria parva Muguga strain (XP_766682.1, NCBI), Toxoplasma gondii (ACY08774.1, NCBI), and Neospora caninum (NCLIV_055360, ToxoDB). A phylogenetic tree was constructed with the orthologue sequences found using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987) in the Mega 4.0 software (Tamura et al., 2007) (Fig. 2A). Maximum Parsimony and Minimum-Evolution methods also displayed a similar tree topology (not shown) (Cavalli-Sforza, 1967; Nakhleh et al., 2005). The phylogenetic tree shows three clades and within one of them, *Plasmodium* species infecting primates (P. vivax, P. knowlesi and P. falciparum) cluster together while species infecting rodents (P. voelii, P. chabaudi and P. berghei) also cluster in a separate branch. As can be observed, RON5 has been maintained across the Apicomplexa phylum (Fig. 2A).

The alignment analysis of RON5 orthologues in *Plasmodium*, carried out with Clustal W (Thompson et al., 1994), shows that PfRON5 displays a greater similarity to its homologue in *P. vivax* (identity 68.7% and similarity 84.8%). The alignment with other members of the phylum *Apicomplexa* shows that this rhoptry protein is more similar to its homologue in *Babesia bovis* (identity 18.6% and similarity 26.5%).

3.2. PfRON5 transcription and sequence in the FCB-2 strain

RNA was extracted from P. falciparum FCB-2 strain synchronized schizonts and amplified by one-step RT-PCR to assess PfRON5 transcription. In the cDNA amplification, a ~3470 bp PCR product was obtained, coding for a 1,156 amino acid long protein (Fig. 2B). Recombinant clone sequences were analyzed using CLC DNA Workbench (CLC bio) and the consensus sequence was deposited in the GenBank database (accession number HQ424431). PfRON5 sequence alignment from FCB-2 and 3D7 strains shows three nonsynonymous nucleotide substitutions producing the following amino acid replacements: Pro92Ser, Phe266Leu and Glu1015Asp, and one synonymous substitution in nucleotide 2058 (A2058C), indicating that this protein is highly conserved among *P. falciparum* strains (data not shown). Interestingly, similar results were reported for TgRON5 (Straub et al., 2009). The alignment analysis carried out with Clustal W (Thompson et al., 1994) also shows that this protein is conserved among the different *Plasmodium* species (Fig. 3).

able 1	
omparison between transmembranal region predictors.	

Predictor	Number of TM regions	Position	Reference
TMHMM2.0	None		Krogh et al. (2001)
Phobius	2	6-24	Kall et al. (2004)
		640-663	
TMpred	5	1-19	Hofmann and Stoffel (1993)
		250-270	
		383-403	
		555-573	
		645-663	
ConpredII	1	554-574	Arai et al. (2004)
Polyphobius	2	554-573	Kall et al. (2005)
		642-663	



Fig. 2. A. PfRON5 orthologues. Neighbor-Joining tree of RON5 amino acid sequences from different genera and species. Numbers represent bootstrap values with 1000 replicates. The scale indicates 0.2 substitutions per site. B. pfron5 gene is transcribed. Line 1 shows a ~3470 bp amplification product of pfron5 from a cDNA sample; line 2 shows the molecular weight marker and line 3 corresponds to the negative control.

3.3. PfRON5 expression peaks in schizont and merozoite stages

Anti-PfRON5 sera were generated by immunizing rabbits with three synthetic peptides based on the primary PfRON5 sequence. Adsorbed rabbit sera were then tested by Western blot against *P. falciparum* lysates from different intra-erythrocytic parasite stages. No parasite proteins were recognized when pre-immune rabbit sera were tested, while hyper-immune sera elicited antibody responses specifically recognizing a ~110 kDa protein, being this pattern only observed in schizonts (42–47 h) and free merozoite (Mz) stages (Fig. 4A). No bands were observed in rings (4–8 h), early trophozoites (19–24 h) or late trophozoites (26–31 h), which suggests that PfRON5 is not expressed in these stages.

3.4. IFA revealed PfRON5 localization within the parasite

An indirect immunofluorescent assay was performed using preadsorbed anti-PfRON5 sera to determine the subcellular localization of this protein. A punctate fluorescence pattern was observed in mature schizonts when a hyper-immune serum sample was assessed; no fluorescence was observed when a pre-immune sample of serum from the same rabbit (negative control) was tested. This punctate staining pattern is typical of rhoptry proteins (Fig. 4B) (Topolska et al., 2004).

4. Discussion

In the 1970s, Aikawa described the formation of a junction between RBC and merozoite membranes as a crucial step in the invasion process. Since the junction moves over the merozoite to allow its invagination, it was then called Moving Junction (Aikawa et al., 1978). Today, 40 years later and with *T. gondii* as a model, some rhoptry and microneme-derived proteins have been identified and associated with the moving junction formation (Alexander et al., 2005; Besteiro et al., 2009; Straub et al., 2009). Additionally, it has been described that the specific interaction between plasmodial AMA-1 (from micronemes) and rhoptry neck proteins is necessary to allow the invasion (Richard et al., 2010).

To date, RON2 and RON4 have been characterized in both *T. gondii* and *P. falciparum*. The identification of RON proteins started with the *Toxoplasma* rhoptry proteome work carried out by Bradley and coworkers, in which four rhoptry neck proteins (RON1, RON2, RON3 and RON4), as well as a big number of other rhoptry proteins were identified (Bradley et al., 2005). Most RON protein studies have been focused on TgRON4, since this protein has been shown to be localized in the moving junction (Leriche and Dubremetz, 1991; Lebrun et al., 2005). Two additional proteins are recovered when the monoclonal antibody directed towards TgRON4 is used to purify this protein by

immunoaffinity chromatography: TgTwinScan_0698 and TgTwin-Scan_4705, the first protein corresponds to RON2 and second protein was going to be known years later as RON5 (Lebrun et al., 2005; Straub et al., 2009). Taking into account that proteins present in the moving junction are conserved in various members of the phylum Apicomplexa, a similar mechanism for host cell invasion has been proposed, and thus, *Toxoplasma* has been taken as a model for characterizing homologous proteins in other parasites such as plasmodia (Besteiro et al., 2009; Straub et al., 2009; Proellocks et al., 2010).

In this study, the gene codifying for RON5 was sequenced and the expression and subcellular localization of the encoded protein were assessed in the *P. falciparum* FCB-2 strain. The PfRON5 gene corresponds to that designated as MAL8P1.73 in the PlasmoDB database (Bahl et al., 2003). No functional domains previously described were detected when the sequence was submitted to some predictors from the Swiss Institute of Bioinformatics (http://www.expasy.org/tools/), such as Prosite and interPro Scan.

Based on the hypothetical PfRON5 sequence from the 3D7 strain, Richard and coworkers suggested that PfRON5 has six potential transmembrane regions according to its hydrophobicity profile (Richard et al., 2010). Since this method only identifies likely transmembrane segments, but it is unable to predict the insideoutside phasing of the segments relative to the cytoplasm (Jones, 2007), we decided to use several bioinformatics tools with the aim of building a consensus on the number of TMs. However, major discrepancies were found (Table 1) probably due to the different approaches used by the tools. 1) TMpred, is based on a statistical analysis of query results in the TMbase database, where the prediction is made using a combination of several weight-matrices for scoring (Hofmann and Stoffel, 1993); 2) TMHMM2.0, Phobius and Polyphobius use machine learning, mainly Hidden Markov Models (HMM), but Phobius also uses Artificial Neural Networks for predicting both TM topology and the presence of a signal peptide in the protein. In Polyphobius, a multiple-sequence alignment is used to calculate the best 'average' path through the states of the HMM (Krogh et al., 2001; Kall et al., 2004, 2005; Jones, 2007). 3) ConpredII is a consensus prediction server, which gives a result based on the average obtained from several predictors (KKD, TMpred, TopPred II, DAS, TMAP, MEMSAT 1.8, SOSUI, TMHMM 2.0 and HMMTOP 2.0) (Arai et al., 2004). In addition to the different approaches followed by the predictors, the dissimilar results could have also been because protozoan sequences are underrepresented in the training data sets of most of these tools in relation to other eukaryotic sequences, which difficults the prediction of TMs in these organisms.

BLAST and phylogenetic analyses show that RON5 is present in several *Plasmodium* species and other members of the phylum *Apicomplexa* (Fig. 2A), suggesting that this protein might have an

H. Curtidor et al. / Gene 474 (2011) 22-28



Fig. 3. Amino acid alignment of RON5 proteins from different *Plasmodium* species. The shading indicates levels of identity, among sequences. White letters on a black background represent amino acid residues that were 100% identical; white letters on a grey background represent amino acid residues that were 80% identical; and black letters on a grey background represent amino acid residues that were 60% identical. Pb, *Plasmodium berghei*; Pc, *Plasmodium chabaudi*; Pv, *Plasmodium vivax*; Pk, *Plasmodium knowlesi*; Pf, *Plasmodium falciparum*.

important biological role in this phylum, which has been maintained along parasite evolution.

Similar to what has been previously described for other *Plasmo*dium falciparum rhoptry proteins such as PfRAP-1 (Howard and Peterson, 1996), PfRAP-2 (Saul et al., 1992) and PfRON2 (Cao et al., 2009), a very limited genetic polymorphism between the two sequenced strains (3D7 and FCB-2) was here found for PfRON5. This conservation gains further importance if the origin of the two strains



Fig. 4. PfRON5 protein expression time and localization. A. Western blot carried out with parasite extracts from synchronized parasite samples at different post-invasion times: rings (4–8 h), early trophozoites (19–24 h), late trophozoites (26–31 h), schizonts (42–47) and free merozoites (Mz). PfRON5 is expressed only in schizonts and free merozoites (Mz) (~110 kDa band). Pl and HI indicate pre-immune and hyper-immune sera, respectively. B. PfRON5 displays a rhoptry localization pattern on the IFA (arrows show the punctate pattern in the hyper-immune serum sample). Hyper-immune serum (HI). Pre-immune serum (PI).

analyzed is taken into account, since 3D7 is an airport isolate found in the Netherlands, while FCB-2 is of Colombian origin. This polymorphism pattern sharply contrasts with that observed for some MSPs such as PfMSP-1 (Miller et al., 1993) or PfMSP-2 (Fenton et al., 1991), where a very high number of substitutions are present. This different behavior might, at least in part, be attributable to the degree of exposure to the immune system that each group of proteins is under, since surface proteins are more exposed and thus are subjected to a greater positive selective pressure. Taking into account that a major problem in developing an effective vaccine is the high degree of genetic diversity and antigenic variation found in target antigens, the use of conserved proteins as vaccine candidates is important for avoiding the polymorphism that the parasite displays (Hisaeda et al., 2005; Casares and Richie, 2009).

In addition to its highly conserved sequence, PfRON5 was here detected by Western blot both in schizonts and free merozoites (stages related to the RBC invasion process) (Fig. 4A), which is consistent with previous microarray data that show that PfRON5 transcription begins during the early schizont stage (Bozdech et al., 2003; Le Roch et al., 2003).

Taken together, PfRON5 expression during parasite stages related to invasion of RBCs, its highly conserved sequence and its previously reported involvement in forming protein complexes with PfAMA-1, turn this into an attractive molecule to be included in further studies aimed at assessing its potential as a vaccine candidate. The *Aotus* monkey model has been considered for many years as ideal for testing vaccine candidates against malaria, since these animals and those belonging to the *Saimiri* genus are among the few that can develop the disease when inoculated with human malaria parasites (Stewart, 2003; Collins et al., 2006). Our group has been working for more than three decades in figuring out a rational methodology for vaccine development which includes functional assays to determine those peptide regions involved in target cell binding and then performing specific modifications to them to allow a better fit into immune system molecules. This approach has allowed us to turn nonimmunogenic conserved binding regions to target cells into immunogenic and protection-inducing ones, when they are tested in the *Aotus* monkey model (Patarroyo et al., 2004, 2008; Cifuentes et al., 2008; Patarroyo and Patarroyo, 2008).

Acknowledgements

We would like to thank Diego Garzón, Daniel Restrepo and Gisselle Rivera for their help and constructive comments. In memory of Professor Gerardo Pérez.

References

- Aikawa, M., Miller, L.H., Johnson, J., Rabbege, J., 1978. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. J. Cell Biol. 77, 72–82.
- Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P., Boothroyd, J.C., 2005. Identification of the moving junction complex of Toxoplasma gondii: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog. 1, e17.
- Alexander, D.L., Arastu-Kapur, S., Dubremetz, J.F., Boothroyd, J.C., 2006. Plasmodium falciparum AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in Toxoplasma gondii. Eukaryot. Cell 5, 1169–1173.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410.
- Arai, M., Mitsuke, H., Ikeda, M., Xia, J.X., Kikuchi, T., Satake, M., Shimizu, T., 2004. ConPred II: a consensus prediction method for obtaining transmembrane topology models with high reliability. Nucleic Acids Res. 32, W390–W393.
- Aurrecoechea, C., Heiges, M., Wang, H., Wang, Z., Fischer, S., Rhodes, P., Miller, J., Kraemer, E., Stoeckert Jr., C.J., Roos, D.S., Kissinger, J.C., 2007. ApiDB: integrated resources for the apicomplexan bioinformatics resource center. Nucleic Acids Res. 35, D427–D430.
- Bahl, A., Brunk, B., Crabtree, J., Fraunholz, M.J., Gajria, B., Grant, G.R., Ginsburg, H., Gupta, D., Kissinger, J.C., Labo, P., Li, L., Mailman, M.D., Milgram, A.J., Pearson, D.S., Roos, D.S.,

Schug, J., Stoeckert Jr., C.J., Whetzel, P., 2003. PlasmoDB: the Plasmodium genome resource. A database integrating experimental and computational data. Nucleic Acids Res. 31, 212–215.

- Baum, J., Gilberger, T.W., Frischknecht, F., Meissner, M., 2008. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from Plasmodium and Toxoplasma. Trends Parasitol. 24, 557–563.
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J.F., Lebrun, M., 2009. Export of a Toxoplasma gondii rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. PLoS Pathog. 5, e1000309.
- Bozdech, Z., Zhu, J., Joachimiak, M.P., Cohen, F.E., Pulliam, B., DeRisi, J.L., 2003. Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of Plasmodium falciparum with a long-oligonucleotide microarray. Genome Biol. 4, R9.
- Bradley, P.J., Ward, C., Cheng, S.J., Alexander, D.L., Coller, S., Coombs, G.H., Dunn, J.D., Ferguson, D.J., Sanderson, S.J., Wastling, J.M., Boothroyd, J.C., 2005. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in Toxoplasma gondii. J. Biol. Chem. 280, 34245–34258.
- Cao, J., Kaneko, O., Thongkukiatkul, A., Tachibana, M., Otsuki, H., Gao, Q., Tsuboi, T., Torii, M., 2009. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in Plasmodium falciparum merozoites. Parasitol. Int. 58, 29–35.
- Casares, S., Richie, T.L., 2009. Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. Curr. Opin. Immunol. 21, 321–330.
- Cavalli-Sforza, L.L., 1967. E.A. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. Am. J. Hum. Genet. 19, 233–258.
- Chitnis, C.E., Blackman, M.J., 2000. Host cell invasion by malaria parasites. Parasitol. Today 16, 411–415.
- Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15 (1993), pp. 532-4, 536-7.
- Cifuentes, G., Bermudez, A., Rodriguez, R., Patarroyo, M.A., Patarroyo, M.E., 2008. Shifting the polarity of some critical residues in malarial peptides' binding to host cells is a key factor in breaking conserved antigens' code of silence. Med. Chem. 4, 278–292.
- Collins, W.E., Sullivan, J.S., Williams, A., Nace, D., Williams, T., Galland, G.G., Barnwell, J.W., 2006. Aotus nancymaae as a potential model for the testing of antisporozoite and liver stage vaccines against Plasmodium falciparum. Am. J. Trop. Med. Hyg. 74, 422–424.
- Collins, C.R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Blackman, M.J., 2009. An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. PLoS Pathog. 5, e1000273.
- Cowman, A.F., Baldi, D.L., Duraisingh, M., Healer, J., Mills, K.E., O'Donnell, R.A., Thompson, J., Triglia, T., Wickham, M.E., Crabb, B.S., 2002. Functional analysis of Plasmodium falciparum merozoite antigens: implications for erythrocyte invasion and vaccine development. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 357, 25–33.
- Curtidor, H., Arevalo, G., Vanegas, M., Vizcaino, C., Patarroyo, M.A., Forero, M., Patarroyo, M.E., 2008. Characterization of Plasmodium falciparum integral membrane protein Pf25-IMP and identification of its red blood cell binding sequences inhibiting merozoite invasion in vitro. Protein Sci. 17, 1494–1504.
- Deleage, G., Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., 2001. ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. Comput. Biol. Med. 31, 259–267.
- Fenton, B., Clark, J.T., Khan, C.M., Robinson, J.V., Walliker, D., Ridley, R., Scaife, J.G., McBride, J.S., 1991. Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite Plasmodium falciparum. Mol. Cell. Biol. 11, 963–971.
- 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., 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., Barrell, B., 2002. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Nature 419, 498–511.
- Good, M.F., 2001. Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads? Nat. Rev. Immunol. 1, 117–125.
- Hisaeda, H., Yasutomo, K., Himeno, K., 2005. Malaria: immune evasion by parasites. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 700–706.
- Hofmann, K., Stoffel, W., 1993. TMbase a database of membrane spanning proteins segments. Biol. Chem. Hoppe Seyler 374, 166.
- Houghten, R.A., 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. Proc. Natl Acad. Sci. USA 82, 5131–5135.
- Howard, R.F., Peterson, C., 1996. Limited RAP-1 sequence diversity in field isolates of Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. 77, 95–98.
- Jones, D.T., 2007. Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. Bioinformatics 23, 538–544.
- Kall, L., Krogh, A., Sonnhammer, E.L., 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. J. Mol. Biol. 338, 1027–1036.
- Kall, L, Krogh, A., Sonnhammer, E.L., 2005. An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information. Bioinformatics 21 (Suppl 1), i251–i257.

- Kaneko, O., 2007. Erythrocyte invasion: vocabulary and grammar of the Plasmodium rhoptry. Parasitol. Int. 56, 255–262.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J. Mol. Biol. 305, 567–580.
- Larsen, J.E., Lund, O., Nielsen, M., 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Res. 2, 2.
- Le Roch, K.G., Zhou, Y., Blair, P.L., Grainger, M., Moch, J.K., Haynes, J.D., De La Vega, P., Holder, A.A., Batalov, S., Carucci, D.J., Winzeler, E.A., 2003. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. Science 301, 1503–1508.
- Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P.J., Vial, H., Dubremetz, J.F., 2005. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during Toxoplasma gondii invasion. Cell. Microbiol. 7, 1823–1833.
- Leriche, M.A., Dubremetz, J.F., 1991. Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of Toxoplasma gondii tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. 45, 249–259.
- Merrifield, R.B., 1963. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85, 2149–2154.
- Miller, L.H., Roberts, T., Shahabuddin, M., McCutchan, T.F., 1993. Analysis of sequence diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (MSP-1). Mol. Biochem. Parasitol. 59, 1–14.
- Morahan, B.J., Sallmann, G.B., Huestis, R., Dubljevic, V., Waller, K.L., 2009. Plasmodium falciparum: genetic and immunogenic characterisation of the rhoptry neck protein PfRON4. Exp. Parasitol. 122, 280–288.
- Nakhleh, L., J.C., Zhao, F., Mellor-Crummey, J., 2005. Reconstructing phylogenetic networks using maximum parsimony. Proc. IEEE Comput. Syst. Bioinform. Conf. 93–102.
- Patarroyo, M.E., Patarroyo, M.A., 2008. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. Acc. Chem. Res. 41, 377–386.
- Patarroyo, M.E., Romero, P., Torres, M.L., Clavijo, P., Moreno, A., Martinez, A., Rodriguez, R., Guzman, F., Cabezas, E., 1987. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. Nature 328, 629–632.
- Patarroyo, M.E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzman, F., Romero, P., Tascon, R., Franco, A., Murillo, L.A., Ponton, G., et al., 1988. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of Plasmodium falciparum malaria. Nature 332, 158–161.
- Patarroyo, M.E., Cifuentes, G., Vargas, L.E., Rosas, J., 2004. Structural modifications enable conserved peptides to fit into MHC molecules thus inducing protection against malaria. Chembiochem 5, 1588–1593.
- Patarroyo, M.E., Cifuentes, G., Bermudez, A., Patarroyo, M.A., 2008. Strategies for developing multi-epitope, subunit-based, chemically synthesized anti-malarial vaccines. J. Cell. Mol. Med. 12, 1915–1935.
- Proellocks, N.I., Kats, L.M., Sheffield, D.A., Hanssen, E., Black, C.G., Waller, K.L., Coppel, R. L., 2009. Characterisation of PfRON6, a Plasmodium falciparum rhoptry neck protein with a novel cysteine-rich domain. Int. J. Parasitol. 39, 683–692.
- Proellocks, N.I., Coppel, R.L., Waller, K.L., 2010. Dissecting the apicomplexan rhoptry neck proteins. Trends Parasitol. 26, 297–304.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., Lopez, R., 2005. InterProScan: protein domains identifier. Nucleic Acids Res. 33, W116–W120.
- Richard, D., Macraild, C.A., Riglar, D.T., Chan, J.A., Foley, M., Baum, J., Ralph, S.A., Norton, R.S., Cowman, A.F., 2010. Interaction between plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the Rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. J. Biol. Chem. 285, 14815–14822.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.
- Saul, A., Cooper, J., Hauquitz, D., Irving, D., Cheng, Q., Stowers, A., Limpaiboon, T., 1992. The 42-kilodalton rhoptry-associated protein of Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. 50, 139–149.
- Stewart, V.A., 2003. Plasmodium vivax under the microscope: the Aotus model. Trends Parasitol. 19, 589–594.
- Straub, K.W., Cheng, S.J., Sohn, C.S., Bradley, P.J., 2009. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. Cell. Microbiol. 11, 590–603.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680.
- Topolska, A.E., Lidgett, A., Truman, D., Fujioka, H., Coppel, R.L., 2004. Characterization of a membrane-associated rhoptry protein of Plasmodium falciparum. J. Biol. Chem. 279, 4648–4656.
- Trager, W., Jenson, J.B., 1978. Cultivation of malarial parasites. Nature 273, 621-622.
- Wheelan, S.J., Church, D.M., Ostell, J.M., 2001. Spidey: a tool for mRNA-to-genomic alignments. Genome Res. 11, 1952–1957.
- WHO, World Malaria Report 2009. World Health Organization (2009).