



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Estudo proteômico das proteínas de *Plasmodium falciparum* exportadas até a membrana plasmática das hemácias infectadas

José Miguel Quintero Ferrer

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Brasília, 2026



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Estudo proteômico das proteínas de *Plasmodium falciparum* exportadas até a membrana plasmática das hemácias infectadas

José Miguel Quintero Ferrer

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, associado à Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular, na área de concentração Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Brasília, 2026

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

QQ7e Quintero Ferrer, José Miguel
Estudo proteômico das proteínas de Plasmodium falciparum exportadas até a membrana plasmática das hemácias infectadas / José Miguel Quintero Ferrer; orientador Sébastien Charneau. Brasília, 2026.
200 p.

Tese(Doutorado em Patologia Molecular) Universidade de Brasília, 2026.

1. Plasmodium falciparum. 2. Proteômica. 3. Proteínas de membrana. 4. Biotinilação seletiva. 5. Espectrometria de massas. I. Charneau, Sébastien, orient. II. Título.

JOSÉ MIGUEL QUINTERO FERRER

**“ESTUDO PROTEÔMICO DAS PROTEÍNAS DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*
EXPORTADAS ATÉ A MEMBRANA PLASMÁTICA DAS HEMÁCIAS
INFECTADAS”**

BANCA EXAMINADORA

Presidente: **Prof. Dr. Sébastien Oliver Charneau (Orientador)**

Universidade de Brasília – Departamento de Biologia Celular

Membro: **Dr. Reynaldo Magalhães Melo**

The Scripps Research Institute

Membro: **Dr. Ricardo Camargo**

Hospital da Criança de Brasília José Alencar – Laboratório de Biologia
Molecular

Membro: **Prof. Dr. Wagner Fontes**

Universidade de Brasília – Departamento de Biologia Celular

Suplente: **Dra. Alexandra Carvalho**

Universidade de Brasília – Pós-graduação em Patologia Molecular –
Faculdade de Medicina

Aprovada em 06 de fevereiro de 2026

Horário: 9:30 h

Local: Ambiente virtual

*A mi amado padre,
quien, con su esfuerzo incansable, sacrificio y amor incondicional, ha sido la
fuente constante de inspiración y apoyo a lo largo de mi vida. Esta tesis es, en gran
parte, el reflejo de su dedicación y su constante impulso para que nunca dejara de
luchar por mis metas. Este logro es tan suyo como mío.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional, pela paciência e pelo amor imensurável. Eu os amo com toda a minha vida e sem vocês, esta conquista não seria possível.

Ao meu supervisor de doutorado, Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau, agradeço pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por me ensinar o caminho da ciência, pelo seu apoio constante, generosidade e amizade. Em especial, muito obrigado por todo o apoio durante a pandemia.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Wagner Fontes, Dr. Reynaldo Magalhães Melo, Dr. Ricardo Camargo e Dra. Alexandra Carvalho, agradeço profundamente por terem aceitado o convite para compor este importante momento da minha trajetória acadêmica.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP): Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa, Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart, Prof. Dr. Wagner Fontes, Prof. Dr. Luís Henrique do Vale, Profa. Dra. Mariana de Souza Castro, Profa. Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima, Profa. Dra. Ana Flávia Alves Parente e Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, agradeço a todos pelos momentos gratificantes compartilhados, pela generosidade de cada um de vocês e pelas tardes de encontro na copa.

Aos amigos do laboratório, do grupo "Patogênese Molecular": Anna Fernanda Vasconcelos, Beatriz Vasconcelos, Camila Hime, Farah Murthada, Flávia Cabral, Laura Barbosa, Lucas Silva de Oliveira, Maria Eduarda Ferreira, Nathalia Schobbenhaus, Paula Goulart, Renan Nascimento, Thiago Albuquerque e meu grande amigo Carlos Paternina, agradeço pela parceria, pela irmandade, pelas risadas e por me fazerem sentir em casa.

Aos amigos do laboratório que, durante este tempo de doutorado, tornaram os dias mais amenos: Marcos Rodrigo Alborghetti, Bruna Gomes, Raphaela Menezes, Reynaldo Magalhães, Isabelle Luz, Igor Daniel Bueno, Luz Chamorro, Tarcila Zuleica Zaparolli, Nuno Domingues, Jaques Ferreira e ao Sr. Antônio.

A Samuel Coelho Mandacaru e Monique Ramos de Oliveira Trugilho, do Laboratório de Toxicologia e Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

À Profa. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos do Laboratório da Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH), agradeço a disponibilidade e a parceria.

À “La Banda”, amigos de toda a América que encheram minha vida de risos e histórias: Arnold Garcia, Brenda Pineda, Cecibel León, Diana Suárez, Jefferson Vélez, Ledymar Foncault, María Camila Acero, Mariel Umaña, Melissa Solorzano, Mónica Molina, Osmel Fleitas, Paul Aguilar, Ricardo Trujillo, Verenice Paredes e Wilson Lopez.

Agradeço especialmente a Mel de Castro Camelo, que com seu amor, paciência e apoio constante, foi minha fonte de força nos momentos mais difíceis, tornando este caminho mais leve e significativo. Obrigado por sempre estar ao meu lado, mesmo nos momentos mais desafiadores, e por acreditar em mim quando mais precisei.

À Universidade de Brasília e ao Programa PAEC OEA/GCUB (No. 001/2019), Acordo de Cooperação entre a Organização dos Estados Americanos e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras, pela bolsa de doutorado em Patologia Molecular, e pela oportunidade de realizar o doutorado, que não apenas ampliou meus conhecimentos acadêmicos, mas também me permitiu crescer como pessoa e profissional.

À Brasília, cidade que, além de ser o cenário do meu doutorado, se tornou meu lar. Sua energia única e o acolhimento de sua gente contribuíram profundamente para minha experiência pessoal.

À Fernanda J. Rodriguez Ramos, onde quer que sua alma repouse, minha eterna gratidão. Obrigado por sua amizade generosa, apoio e por tudo o que você representou nesta jornada.

A todos aqueles que, porventura, eu tenha esquecido, deixo aqui o meu mais sincero agradecimento. Sem o apoio de cada um de vocês, esta jornada não teria sido a mesma.

RESUMO

Plasmodium falciparum é o principal agente etiológico da malária. Durante a fase eritrocitária do ciclo biológico, é capaz de remodelar intensamente os eritrócitos infectados, exportando diversas proteínas que alteram suas propriedades estruturais e funcionais. Esse conjunto de proteínas, conhecido como exportoma, desempenham papéis essenciais na adesão endotelial, evasão imune e aumento da permeabilidade da membrana. Apesar de sua importância, a composição funcional das proteínas exportadas até a superfície da célula hospedeira ainda é pouco compreendida. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo caracterizar as proteínas exportadas por *P. falciparum* até a membrana plasmática dos eritrócitos humanos por meio de análise proteômica. A estratégia experimental incluiu o cultivo da cepa 3D7, sincronização com sorbitol e purificação de formas maduras por gradiente de Percoll®. Com o objetivo de rotular as proteínas parasitárias expostas ou próximas à superfície eritrocitária, foram empregadas três abordagens de biotinylação seletiva: Sulfo-NHS-LC-Biotina, Maleimida-PEG2-Biotina e APEX2. As proteínas biotiniladas foram purificadas por afinidade com estreptavidina e analisadas por espectrometria de massas. Foram identificadas diversas proteínas associadas à fração membranar, incluindo PfEMP1 e KAHRP, amplamente reconhecidas por sua atuação na adesão e na modulação da resposta imune. Adicionalmente, foram detectadas proteínas relacionadas ao tráfego intracelular, ao citoesqueleto e ao complexo PTEX, sugerindo uma organização funcional complexa no processo de exportação. As proteínas identificadas representam candidatos relevantes para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas e vacinais, por estarem expostas na interface parasito-hospedeiro. Este estudo contribui significativamente para o entendimento dos mecanismos moleculares de remodelamento eritrocitário induzido por *P. falciparum* e fornece uma base sólida para futuras investigações funcionais e translacionais.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium falciparum*, proteômica, exportoma, proteínas de membrana, biotinylação seletiva, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Plasmodium falciparum, the primary agent of severe malaria, during the erythrocytic stage of the biological cycle, is capable of extensively remodeling infected erythrocytes by exporting a wide array of proteins that alter their structural and functional properties. This group of proteins, known as the exportome, plays essential roles in endothelial adhesion, immune evasion, and increased membrane permeability. Despite its biological relevance, the functional composition of proteins exported to the surface of the host cell remains poorly understood. In this study, a detailed proteomic characterization of *P. falciparum* proteins exported to the plasma membrane of human erythrocytes was performed. The experimental strategy included in vitro cultivation of the 3D7 strain, synchronization with sorbitol, and purification of mature forms using a Percoll® gradient. Three selective biotinylation approaches were employed —Sulfo-NHS-LC-Biotin, Maleimide-PEG2-Biotin, and APEX2— with the aim of labeling parasitic proteins exposed or proximal to the erythrocyte surface. Biotinylated proteins were purified by streptavidin affinity and analyzed by high-resolution mass spectrometry. Several proteins associated with the membrane fraction were identified, including PfEMP1 and KAHRP, all widely recognized for their roles in cytoadherence and immune modulation. Additionally, proteins related to intracellular trafficking, the cytoskeleton, and the PTEX complex were detected, suggesting a complex functional organization of the export process. The proteins identified represent promising candidates for the development of new therapeutic and vaccine interventions, given their localization at the parasite–host interface. This study provides significant insights into the molecular mechanisms underlying erythrocyte remodeling induced by *P. falciparum* and establishes a solid foundation for future functional and translational research.

Keywords: Malaria, *Plasmodium falciparum*, proteomics, exportome, membrane proteins, selective biotinylation, mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Casos confirmados de malária por cada mil habitantes no ano de 2023 na América.....	22
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> sp. no hospedeiro humano e o vetor.	26
Figura 3. Diagrama esquemático de um merozoíto de <i>Plasmodium</i> sp	29
Figura 4. Morfologia do estágio esquizonte de <i>P. falciparum</i>	31
Figura 5. Modelo integrado do complexo PfRRCR no eritrócito.....	34
Figura 6. Modelo de direcionamento de proteínas PEXEL para o transloco vacuolar	39
Figura 7. Mecanismo de acoplamento de ésteres de N-hidroxissuccinimida (NHS).. ..	51
Figura 8. Mecanismo de acoplamento de Maleimide-PEG2-Biotin.....	52
Figura 9. Mecanismo de geração e acoplamento do radical tirosil nas tirosinas por APEX2	53
Figura 10. Representação esquemática das membranas de diferentes compartimentos de eritrócitos infectados, permeabilizados utilizando estreptolisina O e detergentes	54
Figura 11. Interseção de proteínas de membrana identificadas em diferentes bancos de dados	57
Figura 12. Estratégia experimental geral para a obtenção de frações subcelulares do eritrócito infectado por <i>P. falciparum</i>	61
Figura 13. Estratégia experimental geral para a obtenção e caracterização das frações subcelulares do eritrócito infectado por <i>P. falciparum</i> após biotinylation da membrana.....	62
Figura 14. Sequência de APEX2 recombinante.	65
Figura 15. Oxidação do guaiacol para tetraguaiacol, reação catalisada pela peroxidase.	68
Figura 16. Fracionamento seletivo de eritrócitos utilizando estreptolisina O	71
Figura 17. Obtenção das hemácias parasitadas pelas formas maduras de trofozoítos e esquizontes utilizando Percoll® a 65% (v/v).....	80
Figura 18. Avaliação morfológica por coloração de panótico rápido antes e após tratamento com estreptolisina O	82
Figura 19. Distribuição das proteínas nas frações celulares.	84

Figura 20. Localização das proteínas exportadas na membrana	92
Figura 21. Interseção de proteínas identificadas em diferentes frações subcelulares e banco de dados especializadas.....	95
Figura 22. Rede de interação proteína-proteína gerada com STRING.....	97
Figura 23. Análise funcional por enriquecimento de termos de ontologia gênica (GO) e vias metabólicas.	99
Figura 24. Purificação da APEX2 recombinante por cromatografia de afinidade com níquel.....	103
Figura 25. Análise da expressão e purificação da APEX2 recombinante por <i>Western blot</i> utilizando anticorpo anti-His.....	104
Figura 26. Avaliação da concentração ótima de biotina tiramide para a reação de biotinição catalisada pela APEX2.....	107
Figura 27. <i>Western Blot</i> de proteínas biotiniladas.	108
Figura 28. <i>Western Blot</i> de proteínas biotiniladas eluídas.....	109
Figura 29. Imunofluorescência de eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> (cepa 3D7) após biotinição de proteínas de membrana com EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin e EZ-Link™ Maleimide-PEG2-Biotin.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Banco de dados com o número de proteínas membranares de <i>Plasmodium</i> spp	57
Tabela 2. Distribuição das proteínas identificadas por espectrometria de massas nas frações subcelulares de eritrócitos infectados por <i>P. falciparum</i> e em função da reprodutibilidade por replicata.....	83
Tabela 3. Parâmetros cinéticos da APEX2 recombinante.....	106

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Proteínas humanas da fração membranas	162
Anexo 2. Proteínas humanas da fração citoplasmática	164
Anexo 3. Proteínas humanas da fração parasitária	165
Anexo 4. Proteínas do <i>P. falciparum</i> na fração membranas	167
Anexo 5. Proteínas do <i>P. falciparum</i> na fração citoplasmática.....	176
Anexo 6. Proteínas do <i>P. falciparum</i> na fração parasitária.....	177
Anexo 7. Proteínas do <i>P. falciparum</i> exclusivas da fração membranas.....	188
Anexo 8. Identificação de proteínas de membrana em frações subcelulares de <i>P. falciparum</i> por comparação com banco de dados especializados	192
Anexo 9. Distribuição de proteínas de <i>P. falciparum</i> em clusters com base na rede de interações	195
Anexo 10. Enriquecimento funcional de proteínas de <i>P. falciparum</i> com base em ontologias biológicas e vias metabólicas	199

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma

µl – Microlitro

µM – Micromolar

14-3-3 – Histone phosphosite binding protein

AMA1 – Apical membrane antigen 1

APEX2 – Engineered ascorbate peroxidase 2

Basigin – CD147

BSA – Bovine serum albumin

CD36 – Platelet glycoprotein 4

CDPK – Calcium-dependent protein kinase 1

CDPK5 – Calcium-dependent protein kinase 5

CLAG – Cytoadherence linked asexual protein

CR1 – Complement receptor 1

CRT – Chloroquine resistance transporter

CSP – Circumsporozoite (CS) protein

CSS – Cysteine-rich small secreted protein

CYRPA – Cysteine-rich protective antigen

Da – Dalton

DAF/CD55 – Complement decay-accelerating factor

DDA – Aquisição dependente de dados (Data-dependent acquisition)

DMSO – Dimetilsulfoxídeo

DTT – Ditioniotreitol

EBA175 – Erythrocyte binding antigen 175

EBL1 – Erythrocyte binding like protein 1

eIF – Eukaryotic translation initiation factor

EXP1, EXP2 – Exported protein 1 / 2

FC – Fração citoplasmática

FDR – False discovery rate

FM – Fração membranária

FP – Fração parasitária

FWHM – Full width at half maximum (Resolução do espectrômetro)

g – Grama

g – Vezes a aceleração da gravidade

GAP – Glideosome-associated protein

GLURP – Glutamate-rich protein

GYPA, GYPB, GYPC – Glycophorin A / B / C

h – Hora

HSP40, HSP70, HSP101 – Heat shock proteins

HT – Host targeting motif (Sinônimo de PEXEL)

ICAM1 – Intercellular adhesion molecule 1

KAHRP – Knob-associated histidine-rich protein

K_{cat} – Número de turnover, ou constante catalítica

K_d – Constante de dissociação

kDa – Quilodalton

K_m – Constante de Michaelis-Menten

M – Molar

M1AAP – M1-family alanyl aminopeptidase

MAHRP1 – Membrane associated histidine-rich protein 1

MC-2TM – Maurer's cleft two transmembrane protein

MESA – Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen

mg – Miligrama

min – Minuto

ml – Mililitro

mM – Milimolar

MSP – Merozoite surface proteins

MTIP – Myosin tail domain interacting protein

MYOA – Myosin A

ng – Nanograma

NHS – N-hidroxissuccinimida (N-Hydroxysuccinimide)

nm – Nanômetro

nmol – Nanomol

NPP – Novas vias de permeabilidade (New Permeability Pathways)

OD – Densidade óptica (Optical Density)

p/v – Peso por volume

P113 – Surface protein P113

PDI8 – Protein disulfide-isomerase

PECAM1 – Platelet endothelial cell adhesion molecule

PEXEL – Plasmodium export element

PfCERLI1 – Cytosolically exposed rhoptry leaflet interacting protein 1

PfEMP1, PfEMP2, PfEMP3 – Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein

PfRCR – Complex RH5–CYRPA–RIPR

pH – Potencial hidrogeniônico (pH)

PHIST – Plasmodium helical interspersed subtelomeric

PKAc – cAMP-dependent protein kinase

PLP2 – Perforin-like protein 2

PMIX, PMIII, PM4 – Plasmepsin IX / III / IV

pmol – Picomol

ppm – Partes por milhão

PPM2 – Protein phosphatase

PSAC – Plasmodial Surface Anion Channel

PTEX – Plasmodium Translocon of Exported Proteins

PV1, PV2 – Parasitophorous vacuolar protein 1 / 2

RAMA – Rhoptry-associated membrane antigen

REAC – Reactome (Base de vias metabólicas)

RESA – Ring-infected erythrocyte surface antigen

RH5 – Reticulocyte-binding protein homologue

RHOPH2, RHOPH3 – High molecular weight rhoptry protein 2 / 3

RIFINs – Repetitive interspersed families of polypeptides

RIPR – Rh5 interacting protein

RLU – Relative light units

RON2, RON3 – Rhoptry neck protein 2 / 3

RPL2, RPL23, RPL38 – Ribosomal proteins

rpm – Rotações por minuto

RPN – Ribosomal subunit protein N

RPT – Repetitive polypeptides

s – Segundo

SBP1 – Skeleton-binding protein 1

SEC61, SPC25 – Components of the secretion complex

SEMP1 – Small exported membrane protein 1

SERA4, SERA5 – Serine Repeat Antigens 4 / 5

SHMT – Serine hydroxymethyltransferase

SLO – Streptolisina O

STEVORs – Sub-telomeric variable open reading frame

SUB1 – subtilisin-like protease 1

SURFINs – Surface-associated interspersed proteins

TFA – Trifluoroacetic acid

TRAMP – Thrombospondin-related apical membrane protein

TRiC – TCP1 Ring Complex

tRIP – tRNA import protein

TRX2 – Thioredoxin 2

UIS2 – Serine/threonine protein phosphatase

v/v – Volume por volume

VCAM1 – Vascular cell adhesion protein 1

V_{max} – Velocidade máxima

VP1 – V-type H⁺-translocating pyrophosphatase

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Malária: Uma visão global	21
1.1.1. Impactos sociais e de saúde.....	21
1.1.2. O papel dos vetores na transmissão da malária.....	23
1.2. O parasito <i>Plasmodium</i> : Ciclo de vida e características morfológicas .	23
1.2.1. <i>Plasmodium</i> spp.	23
1.2.2. O ciclo de vida complexo do <i>P. falciparum</i>	24
1.2.3. A função de organelas e compartimentos celulares durante o ciclo de vida do <i>P. falciparum</i>	27
1.3. O proteoma do <i>P. falciparum</i>	31
1.4. Biologia do eritrócito e alterações induzidas por <i>P. falciparum</i>	32
1.4.1. Proteínas da membrana de eritrócitos e invasão parasitária.....	33
1.4.2. Modulação do microambiente intracelular.	36
1.4.3. Citoaderência ao endotélio pelos eritrócitos infectados.....	40
1.4.4. Egresso dos merozoítos do eritrócito	43
1.5. Estratégias terapêuticas.....	44
1.5.1. Antimaláricos utilizados para o tratamento da malária	45
1.5.2. Vacina contra <i>Plasmodium</i> : avanços e perspectivas.....	47
1.6. Proteínas de membrana como alvos terapêuticos	48
1.7. Métodos de enriquecimento e isolamento de proteínas de membrana	49
1.7.1. Estratégias de marcação seletiva de proteínas de membrana	49
1.7.2. Lise e centrifugação diferencial	53
1.8. Espectrometria de massas e biologia estrutural.....	54
1.9. Plataformas de dados para o estudo de proteínas de membrana.....	55
II. OBJETIVOS	58
2.1. Objetivo general	58
2.2. Objetivos específicos	58
III. JUSTIFICATIVA	59
IV. METODOLOGIA	61
4.1. Cultivo e sincronização de <i>P. falciparum</i> e obtenção das formas parasitárias maduras e lise seletiva.....	62
4.1.1. Cultivo sincronizado de <i>P. falciparum</i>	62
4.1.2. Separação de formas parasitárias de <i>P. falciparum</i> por meio de gradientes de Percoll®.....	63
4.2. Obtenção eficiente da APEX2 recombinante	65
4.2.1. Expressão heteróloga da APEX2	65
4.2.2. Purificação da APEX2 recombinante por cromatografia de afinidade	66
4.2.3. Complementação <i>in vitro</i> com hemina e medição da concentração da holoproteína	67

4.2.4. Cálculos cinéticos enzimáticos	67
4.2.5. Determinação da concentração ótima de biotina tiramida para a reação catalisada pela APEX2 recombinante	68
4.3. Biotinilação das proteínas de membrana do eritrócito infectado com <i>P. falciparum</i>	69
4.3.1. Biotinilação das proteínas da membrana dos eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i>	69
4.4. Lise seletiva com estreptolisina O	70
4.5. Enriquecimento das proteínas biotiniladas com partículas magnéticas de estreptavidina	71
4.6. Citolocalização das proteínas biotiniladas por ensaio de imunofluorescência.....	73
4.7. Preparação de amostras para análise proteômica	73
4.7.1. Redução, alquilação e digestão das proteínas por tripsina.....	73
4.7.2. Dessalinização de peptídeos por microcolunas de fase reversa ...	74
4.7.3. Análise por espectrometria de massas	75
4.7.4. Análise de dados	76
4.8. Construção de uma base de dados de proteínas membranares do <i>Plasmodium</i> spp.	76
4.9. Construção de redes de interação proteica.....	77
4.10. Análise funcional por enriquecimento de ontologia gênica (GO).....	77
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1. Isolamento de eritrócitos parasitados por estágios tardios de <i>P. falciparum</i> usando gradientes de Percoll®	79
5.2. Fragmentação por lise seletiva com estreptolisina O	80
5.3. Análise das frações	82
5.3.1. Identificação proteica nas replicatas experimentais.....	82
5.3.2. Distribuição proteica, compartilhamento e exclusividade entre frações subcelulares	84
5.4. Proteínas humanas da fração membranares identificadas	86
5.4.1. Modificações estruturais e remodelamento do citoesqueleto do eritrócito	87
5.5. Proteínas do <i>P. falciparum</i> da fração membranares identificadas em processos associados ao ciclo intraeritrocitário	88
5.5.1. Proteínas exportadas e o remodelamento do eritrócito	88
5.5.2. Proteínas envolvidas no tráfego vesicular e membranas	89
5.5.3. Enzimas ligadas ao metabolismo lipídico	90
5.5.4. Sinalização mediada por fosforilação	90
5.5.5. Maquinaria de síntese e degradação proteica	91
5.6. Proteínas do merozoíto associadas ao processo de invasão	92
5.6.1. Proteínas essenciais para a invasão e organelas apicais	93
5.6.2. Componentes do motor actomiosínico e do citoesqueleto	93
5.7. Integração de banco de dados de membranas e estratégias terapêuticas na infecção por <i>P. falciparum</i>	94

5.8. Perfis funcionais e organização em clusters de proteínas da membrana do eritrócito infectado.....	96
5.8.1. O core Funcional do parasito e a dinâmica de exportação.....	97
5.8.2. Mecanismos de transporte e modificação da membrana	98
5.8.3. Regulação, replicação e mecanismos desconhecidos	98
5.9. Análise funcional de enriquecimento da fração membranar por termos de ontologia gênica (GO):.....	99
5.9.1. Função molecular e estrutura ribossomal.....	99
5.9.2. Processos biológicos enriquecidos.....	100
5.9.3. Componentes celulares e localização	100
5.9.4. Vias metabólicas.....	100
5.10. Marcação seletiva por biotinação para enriquecimento de proteínas de superfície	101
5.10.1. Produção da APEX2 recombinante para aplicação em biotinação seletiva.....	102
5.10.2. Biotinação das proteínas e lise da membrana de eritrócitos infectados.....	107
5.10.3. Visualização de proteínas biotiniladas por microscopia de fluorescência	109
5.11. Análise por espectrometria de massas	111
VI. CONCLUSÃO	112
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
VIII. ANEXOS	162

I. INTRODUÇÃO

1.1. Malária: Uma visão global

1.1.1. Impactos sociais e de saúde

A malária, ou paludismo, constitui uma enfermidade tropical infecciosa originada por protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium*, sendo transmitido por mosquitos do gênero *Anopheles*. Essa condição representa uma significativa fonte de morbidade e mortalidade em diversas regiões do globo. O período de incubação da infecção compreende 7 a 14 dias, manifestando-se através de sintomas como calafrios, cefaleia, mialgia, anemia hemolítica, icterícia, e distintos ciclos febris ocorrendo a cada 24, 48 ou 72 horas (Moxon et al., 2020).

A severidade da doença está intrinsecamente ligada à carga parasitária, à espécie e linhagem do *Plasmodium* causador da infecção, assim como ao estado imunológico do hospedeiro afetado. Na ausência de tratamento apropriado, a malária pode progredir, desencadeando complicações como insuficiência respiratória, edema pulmonar, hipoglicemia, anemia grave, convulsões e, em casos extremos, resultar em óbito. Especialmente na forma mais crítica, conhecida como malária cerebral, a taxa de mortalidade atinge 90%, contrastando com 20% quando o tratamento é administrado de forma adequada no início da doença (MacKintosh et al., 2004; L. H. Miller et al., 2002) e a gravidade da doença não tem associação por multiplicidade de infecção (*Multiplicity of infection*) (Earland et al., 2019; Pacheco et al., 2016). As crianças, idosos e primíparas que moram em áreas endêmicas são especialmente vulneráveis à forma grave da doença (Gen et al., 2021).

A malária é endêmica em 83 países. No ano de 2023, 96% das mortes por malária no mundo ocorreram em 29 países, onde o continente africano carrega o maior fardo, representando 94% dos casos globais e 95% das mortes. Estima-se que 246 milhões de pessoas foram afetadas nesta região, que foi responsável pela morte de 569 mil pessoas no mesmo ano, sendo a maioria (76%) crianças menores de 5 anos. Entretanto, após uma diminuição na incidência de casos entre 2000 e 2015, impulsionada por avanços no tratamento e medidas preventivas, o número de casos voltou a aumentar a partir de 2015, com 263 milhões de casos registrados em 2023. Esse aumento é atribuído a fatores como resistência aos medicamentos e inseticidas, além de desafios em programas de controle (WHO, 2024).

Na Região das Américas, 76,6% dos 548.000 casos estimados de malária em 2023 concentraram-se na bacia amazônica, com Venezuela (135.000), Brasil (163.000) e Colômbia (122.000) como principais epicentros. Embora a Venezuela tenha reduzido substancialmente sua carga de casos em relação ao pico de 467.000 registrado em 2019 —reflexo inicial das restrições de mobilidade impostas pela pandemia de COVID-19 e do impacto da crise na mineração ilegal—, novos focos surgiram com aumentos expressivos, como em Panamá (+100%, impulsionado pela migração na região de Darién), Guatemala (+64,1%), Costa Rica (+33,7%) e Guiana (+33,1%). Esses aumentos estão associados principalmente a atividades extrativas irregulares e à mobilidade populacional. A transmissão tem afetado de forma desproporcional comunidades indígenas —responsáveis por 31% dos casos na região— e populações afrodescendentes com acesso precário aos serviços de saúde, situação agravada por condições climáticas adversas e pelo ritmo acelerado de urbanização. Apesar desses desafios, Belize obteve a certificação de eliminação da malária em 2023, e o Suriname manteve o status de zero casos autóctones pelo segundo ano consecutivo, evidenciando avanços concretos no processo de eliminação (**Figura 1**) (Torres et al., 2022; WHO, 2021, 2024).

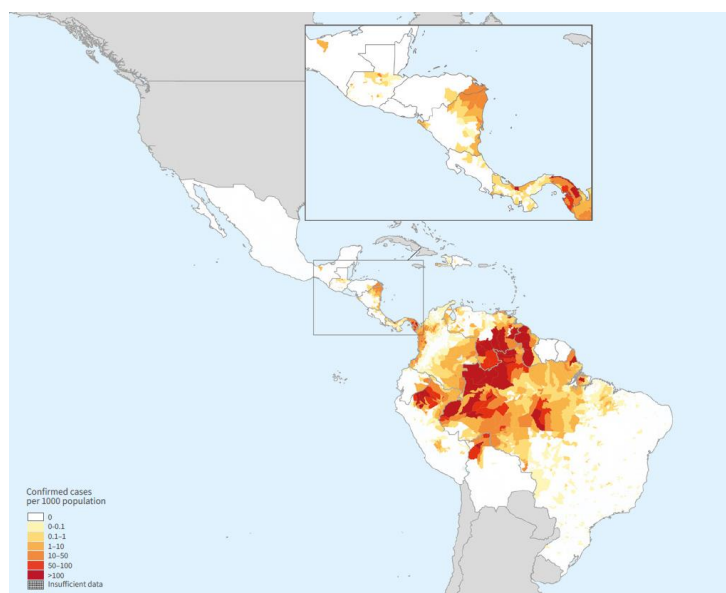


Figura 1. Casos confirmados de malária por cada mil habitantes no ano de 2023 na América. As tonalidades indicam o número de casos confirmados por mil habitantes, evidenciando padrões geográficos de transmissão e áreas endêmicas com maior carga da doença. Os dados refletem a persistência da malária em regiões específicas, com destaque para áreas tropicais e subtropicais onde a transmissão permanece ativa. Fonte: (WHO, 2024)

1.1.2. O papel dos vetores na transmissão da malária

O gênero *Anopheles* destaca-se como o único capaz de efetuar a transmissão do *Plasmodium* em seres humanos, e engloba aproximadamente 510 espécies de mosquitos anofelinos (Harbach, 2013), apresentando ampla distribuição global, inclusive em regiões árticas. A efetividade da transmissão da malária está intrinsecamente vinculada às características biológicas dos vetores e às flutuações climáticas, elementos que possivelmente explicam a maior parte da variabilidade regional na intensidade da transmissão do mencionado parasito (Beier, 1998; Kiszewski et al., 2004).

O gênero varia entre diferentes regiões, algumas das quais se destacam como vetores mais competentes, no continente africano, as nove espécies pertencentes ao complexo *Anopheles gambiae* assumem papel preponderante como os vetores mais significativos e eficientes na transmissão da malária (Fanello et al., 2002; Loughlin, 2020; Mustafa et al., 2021; Sinka et al., 2010). No continente asiático, a espécie *An. stephensi* se destaca como predominante nesse contexto (Ishtiaq et al., 2021), enquanto que na região amazônica, *An. darlingi* (*Nyssorhynchus darlingi*) emerge como a espécie mais abundante nas áreas endêmicas (Lainhart et al., 2015; Marinotti, 2021; Sinka et al., 2012; Torres et al., 2022).

1.2. O parasito *Plasmodium*: Ciclo de vida e características morfológicas

1.2.1. *Plasmodium* spp.

Os *Plasmodium* spp. são protozoários unicelulares eucarióticos pertencentes ao filo Apicomplexa, que abrange 175 espécies capazes de parasitar uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos, aves e répteis. Dentre as espécies de *Plasmodium* identificadas, cinco são comumente responsáveis pela malária em humanos, destacando-se *P. falciparum*, a espécie mais letal, além de *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. Adicionalmente, outras espécies encontradas em primatas não humanos como *P. brasilianum*, *P. coatneyi*, *P. cynomolgi* e *P. simium* embora com uma incidência significativamente mais rara, também têm o potencial de infectar seres humanos (Lover et al., 2018; Mewara et al., 2023; Milner, 2018; Phillips et al., 2017; Tazi & Ayala, 2011; Yap et al., 2021).

As características biológicas mais importantes que sustentam a eficácia deste parasito são sua capacidade de invadir eritrócitos, alto índice de multiplicação

assexuada, e sua natureza evasiva do sistema imune do hospedeiro (Malaria: Biology and Disease, 2016).

1.2.2. O ciclo de vida complexo do *P. falciparum*

O ciclo de vida do parasito da malária (**Figura 2**) é caracterizado por uma complexidade singular, envolvendo dois hospedeiros distintos, em duas etapas distintas: uma etapa de reprodução sexuada (esporogonia) que ocorre no intestino médio do mosquito e uma etapa de reprodução assexuada (esquizogonia), que se desencadeia no hospedeiro humano. Na etapa referente ao hospedeiro humano, é possível diferenciar dois estágios cruciais: a fase hepática e a fase eritrocítica (Frederich et al., 2002).

O ciclo se inicia com a ingestão de sangue contendo as formas sexuais imaturas do *Plasmodium* por um mosquito fêmea *Anopheles* (hematófaga). Os gametócitos, uma vez ingeridos, se diferenciam em macrogametas (feminino) e microgametas (masculinos) no intestino médio do inseto. Durante a fusão entre gametas, a formação do zigoto resulta em um estágio diploide do desenvolvimento, que permite uma recombinação homóloga entre as informações genéticas parentais. Esse processo é responsável pela criação de uma vasta variabilidade genética na prole do parasito, o que é fundamental para sua sobrevivência e propagação. De fato, a alta taxa de polimorfismo genético do *P. falciparum* é uma estratégia adaptativa que lhe permite evitar a destruição pelas respostas imunológicas do hospedeiro humano, uma vez que elas geralmente são dirigidas contra os antígenos variáveis do parasito.

Após a formação do zigoto, em um intervalo de 18 a 24 horas, o produto móvel resultante da fecundação, conhecido como oocineto, atravessa a membrana peritrófica e a célula epitelial do intestino médio. Este processo culmina na sua transformação em oocisto, situado abaixo da membrana basal do epitélio do intestino médio. Após um período de 7 a 15 dias a partir da infecção, um único oocisto pode gerar mais de 10.000 esporozoítos, variando de acordo com a espécie de *Plasmodium* e a temperatura ambiente vigente. Os esporozoítos móveis percorrem o trajeto em direção às glândulas salivares, infiltrando-se nas células secretoras acinares, e emergindo posteriormente no lado apical da membrana plasmática dessas células em direção ao ducto da glândula salivar (Aly et al., 2009).

No segundo ciclo de alimentação, o mosquito injeta esporozoítos no hospedeiro. Estudos indicam que a maioria desses esporozoítos é injetada na derme,

enquanto apenas 50% é introduzido diretamente nos vasos sanguíneos (Amino et al., 2006; Graewe et al., 2012; Guilbride et al., 2012). Dentro de um período de 60 minutos após a inoculação, os esporozoítos são levados até os sinusoides hepáticos, onde o fluxo sanguíneo é reduzido, favorecendo a interação entre diferentes proteínas da superfície do esporozoíto e da matriz extracelular. Após esse reconhecimento inicial, os esporozoítos penetram a barreira sinusoidal através das células de *Kupffer*, formam um vacúolo que envolve o parasito, mas não o destrói (Lindner et al., 2012).

Os esporozoítos permanecem no fígado por um período de 9 a 16 dias, onde se desenvolvem em esquizontes exoeritrocíticos, que podem conter de 30.000 a 40.000 merozoítos. Em algumas espécies, como *P. vivax* e *P. ovale*, há um estágio dormente denominado hipnozoíto, que pode permanecer no fígado por semanas ou até mesmo muitos anos antes do desenvolvimento da esquizogonia exoeritrocítica (Krotoski et al., 1982). Esse fenômeno pode levar a recaídas da infecção. Por outro lado, *P. falciparum* e *P. malariae* não apresentam essa fase persistente, no entanto, *P. malariae* pode permanecer no sangue por muitos anos se tratada inadequadamente (Frederich et al., 2002). Durante o estágio pré-eritrocítico, o hospedeiro é assintomático (Langhorne et al., 2002; Prudêncio et al., 2006).

A fase eritrocítica tem início com a ruptura do esquizonte hepático (exoeritrocítico), o que resulta na liberação de 10.000 a 30.000 merozoítos na corrente sanguínea (Frederich et al., 2002). Dentro de 30 segundos após a liberação, cada merozoíto se fixa em receptores específicos na membrana dos eritrócitos. O processo de invasão dos eritrócitos pelos parasitos da malária envolve uma série complexa de eventos que dependem de interações entre receptores presentes nas superfícies do eritrócito e do merozoíto (Chitnis & Blackman, 2000).

A seguir, ocorre a invaginação da membrana dos eritrócitos, permitindo que o merozoíto entre no eritrócito e se envolva em uma invaginação da membrana da célula hospedeira que se torna o vacúolo parasitóforo, remodelado por lipídios e proteínas secretadas pelo parasito (Geoghegan et al., 2021; Lingelbach & Joiner, 1998).

O parasito passa por um processo de desenvolvimento, começando como anel e progredindo para a fase tardia de trofozoíto e, em seguida, após divisões mitóticas, para a fase de esquizontes, que contém de 6 a 32 merozoítos, dependendo da espécie do parasito. Quando o esquizonte se rompe, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea e invadem outros eritrócitos para continuar o ciclo. Durante esse ciclo repetitivo, uma pequena proporção de parasitos assexuais se diferencia em

gametócitos. Assim, o ciclo infeccioso de *Plasmodium* pode se repetir e recomeçar. É importante destacar que é a fase sanguínea assexual que está associada aos sintomas da doença (Frederich et al., 2002).

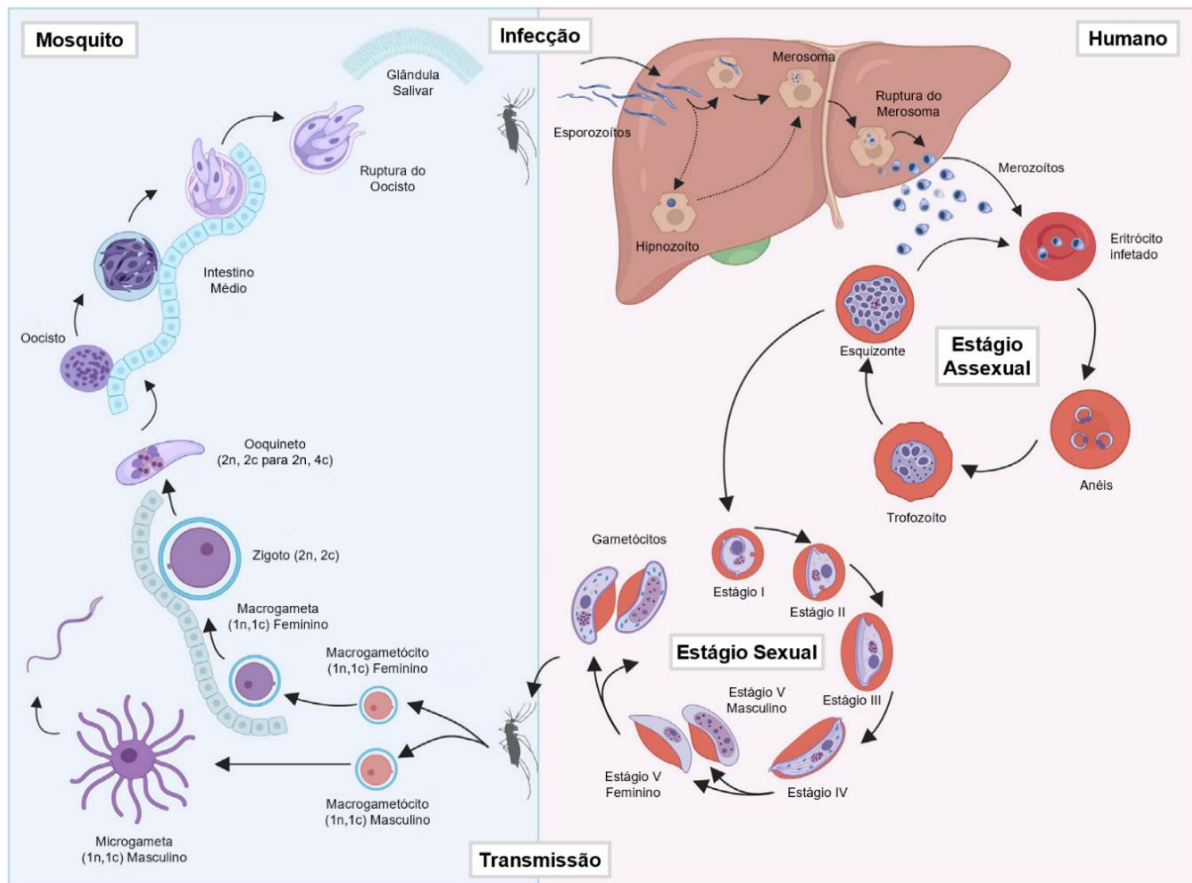


Figura 2. Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. no hospedeiro humano e o vetor. Representação esquemática do ciclo de vida do *Plasmodium* spp. no hospedeiro vertebrado. A infecção tem início com a inoculação de esporozoítos por fêmeas do mosquito *Anopheles* durante a hematofagia. Os esporozoítos rapidamente alcançam o fígado, onde invadem hepatócitos e se desenvolvem em esquizontes hepáticos, culminando na liberação de merozoítos na corrente sanguínea. Esses merozoítos invadem os eritrócitos, estabelecendo o ciclo eritrocítico, que compreende as fases de anel, trofozoíto e esquizonte. A ruptura dos eritrócitos libera novos merozoítos que reiniciam o ciclo de invasão. Parte dos parasitas diferencia-se em gametócitos, formas sexuais que, ao serem ingeridas por um novo vetor durante o repasto sanguíneo, dão continuidade ao ciclo no mosquito, perpetuando a transmissão da malária. Modificado da fonte: (Chahine & Le Roch, 2022)

1.2.3. A função de organelas e compartimentos celulares durante o ciclo de vida do *P. falciparum*

O *Plasmodium* apresenta uma notável especialização e organização das organelas em cada fase de seu ciclo vital. Nesse contexto, os merozoítos exibem diversas organelas especializadas, como o apicoplasto, as roptrias, os micronemas e os grânulos densos, algumas das quais são diretamente envolvidas na invasão celular (**Figura 3**). Durante o ciclo intraeritrocitário, o parasito também forma estruturas específicas para assegurar sua sobrevivência e replicação, como o vacúolo parasitóforo, os J-dots, o vacúolo digestivo e as fendas de Maurer (**Figura 4**). Essas estruturas desempenham um papel determinante na modulação da interação entre o *Plasmodium* e o hospedeiro, facilitando a adaptação do parasito ao ambiente intracelular e contribuindo para a evasão da resposta imunológica.

1.2.3.1. Apicoplasto

O apicoplasto é um plastídio endossimbiótico secundário não fotossintético exclusivo de Apicomplexa, incluindo *P. falciparum*. Cada parasito possui um único apicoplasto, cuja morfologia varia ao longo do ciclo parasitário, passando de uma estrutura simples em merozoítos e anéis para uma forma reticulada no esquizonte multinucleado durante a fase intraeritrocítica. Possui quatro membranas e granulações específicas (Hopkins et al., 1999; Stanway et al., 2009; R. F. Waller et al., 2000), sendo transmitido de forma matrilinear, separada do núcleo do parasito (Creasey et al., 1994). O apicoplasto é essencial para a biossíntese de ácidos graxos, isoprenoides, heme e aglomerados de enxofre-ferro (Ralph et al., 2004; Sheiner et al., 2013), e seu genoma circular de 35 kb é semelhante ao das plantas. A maioria das proteínas necessárias é produzida pelo genoma nuclear e direcionada ao apicoplasto via secreção, com a ajuda de chaperonas citosólicas como HSP70 (heat shock protein 70) e 14-3-3 (histone phosphosite binding protein) (Boucher et al., 2018; Foth et al., 2003; McFadden, 2000; Wilson et al., 1996). Sua dependência metabólica o torna um alvo terapêutico promissor, com estudos focados em inibidores seletivos para as aminoacil tRNA sintetases (Guerra & Winzeler, 2022).

1.2.3.2. Roptrias

As roptrias, organelas secretoras especializadas, desempenham funções cruciais nos processos de invasão celular e formação do vacúolo parasitóforo durante

a fase intracelular do ciclo de vida de *Plasmodium*. Estas estruturas armazenam um repertório proteico único, composto por moléculas sem ortólogos identificáveis mesmo em parasitos filogeneticamente próximos. Embora os mecanismos exatos de transporte proteico permaneçam pouco elucidados, evidências sugerem a existência de vias de sinalização e sistemas de ordenação molecular especializados que direcionam essas proteínas para as roptrias (Richard et al., 2009). Várias proteínas das roptrias, como RHOPH3 (high molecular weight rhoptry protein 3), RAMA (rhoptry-associated membrane antigen) e PfCERL1 (cytosolically exposed rhoptry leaflet Interacting protein 1), foram identificadas como essenciais para a invasão da célula hospedeira e a morfogênese das roptrias (Liffner et al., 2020; Sherling et al., 2017, 2019; Suarez et al., 2019). Estudos recentes também revelaram a estrutura do sistema de secreção das roptrias e a presença de um aparelho secretor de roptrias em merozoítos de *P. falciparum*, destacando etapas anteriormente desconhecidas no processo de secreção das roptrias (Martinez et al., 2022).

1.2.3.3. Micronemas

As micronemas são organelas secretoras que liberam diversas proteínas, incluindo aquelas pertencentes à família de proteínas de ligação à hemácia, como a proteína AMA1 (apical membrane antigen 1). Essas proteínas desempenham um papel ativo no processo de invasão, facilitando a ligação do parasito à superfície das hemácias do hospedeiro e, subsequentemente, permitindo a entrada na hemácia (Bahl, 2003; Healer et al., 2002; Rawat et al., 2023).

1.2.3.4. Grânulos densos

Os grânulos densos são organelas secretoras especializadas em parasitos *Apicomplexa* (Mercier et al., 2005). Estão envolvidos na transferência de proteínas e outras moléculas dentro do parasito e da célula hospedeira, desempenhando papel chave no crescimento e sobrevivência do parasito (W. Trager et al., 1992). Até o momento, apenas algumas proteínas foram identificadas como proteínas de grânulos densos, sendo necessária uma elucidação adicional dessas moléculas para compreender melhor o papel dos densos grânulos na malária (Morita et al., 2018; Nessel et al., 2020; Vallintine & van Ooij, 2023).

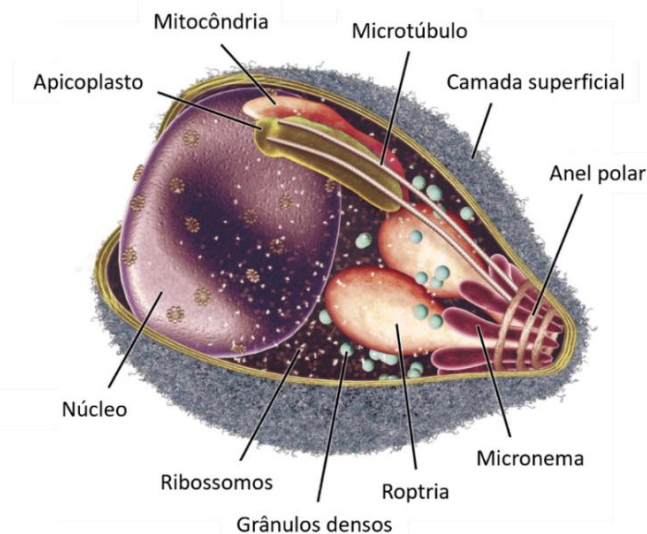


Figura 3. Diagrama esquemático de um merozoíto de *Plasmodium* sp. Ilustração representando a organização estrutural de um merozoíto, a forma invasiva do parasito responsável por penetrar os eritrócitos. São evidenciadas as organelas especializadas envolvidas no processo de invasão, incluindo as roptrias, micronemas e o complexo anular apical. Também estão representadas a mitocôndria, o núcleo e o plastídio apicoplasto, estruturas essenciais para o metabolismo e a viabilidade do parasito. Modificado da fonte: (Cowman & Crabb, 2006)

1.2.3.5. Vacúolo parasitóforo

O vacúolo parasitóforo é uma estrutura membranosa formada a partir da membrana da célula hospedeira durante o desenvolvimento eritrocítico do *Plasmodium* (Matz et al., 2020). Esse compartimento é essencial para a sobrevivência do parasito, atuando na aquisição de nutrientes, exportação de fatores de virulência e remodelação da célula hospedeira. A membrana do vacúolo parasitóforo é modificada por proteínas secretadas pelas organelas do parasito (Schnider et al., 2018), as quais são fundamentais para a manutenção do ambiente intracelular favorável à replicação parasitária (Iriko et al., 2018). Dentre essas proteínas, destaca-se a EXP1 (exported protein 1), localizada nos grânulos densos dos merozoítos e posteriormente transportada à membrana do vacúolo parasitóforo após a invasão (Nessel et al., 2020).

1.2.3.6. J-dots

Os *J-dots* são estruturas intracelulares especializadas envolvidas no transporte de proteínas, do citosol até a superfície do eritrócito. Além disso, participam do tráfego e do correto dobramento de proteínas exportadas, como as chaperonas da família

HSP40 (heat shock protein 40) (*J domain proteins*), que desempenham um papel essencial na modificação da célula hospedeira (Blatch, 2022; Petersen et al., 2016; Sahu et al., 2024). Além disso, transportam HSP70 (heat shock protein 70) e estão estreitamente associados à proteína PfEMP1 (erythrocyte membrane protein 1). O direcionamento de HSP40 aos *J-dots* é um processo exclusivo de eritrócitos humanos infectados por *P. falciparum*, não sendo conservado em eritrócitos de camundongos infectados por *P. berghei*, o que sugere que essas estruturas são específicas de *P. falciparum* (Külzer et al., 2012; Petersen et al., 2016).

1.2.3.7. Vacúolo digestivo

O vacúolo digestivo, organela semelhante a um lisossomo, desempenha a função crítica de degradar a hemoglobina, principal componente do eritrócito. Durante este processo de proteólise, o grupo heme é liberado e subsequentemente oxidado para o estado férrico Fe(III)-protoporfirina IX. Este composto apresenta elevada toxicidade devido à sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio, que podem causar danos significativos a componentes celulares essenciais, incluindo membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos (Bakar et al., 2010; Goldberg et al., 1991). O *Plasmodium* converte o heme em um cristal insolúvel e inerte, a hemozoína, por um processo de biomineralização, neutralizando essa toxicidade (Egan, 2008). O pH ácido do vacúolo é igualmente crucial para a ação de antimaláricos como a cloroquina, que se acumula nesse compartimento e inibe a formação de hemozoína, levando ao acúmulo letal de heme livre (Hayward et al., 2006). A estrutura do vacúolo digestivo é bem estudada, e diversos métodos têm sido empregados para investigar sua composição molecular e função (Ouologuem et al., 2023). Características únicas do vacúolo digestivo e a importância crucial da aquisição de nutrientes fornecem alvos terapêuticos para o tratamento da malária (Wiser, 2024).

1.2.3.8. Fendas de Maurer

As fendas de Maurer são estruturas membranosas especializadas de túbulos ramificados e cisternas estendidas entre a membrana do vacúolo parasitóforo e a membrana citoplasmática dos eritrócitos infectados. Acredita-se que, a função primordial destas estruturas está no tráfego de proteínas oriundas do parasito, as quais são direcionadas tanto para a superfície da célula hospedeira quanto para o citosol do eritrócito. Essencialmente, as fendas de Maurer estão implicadas na

remodelação da membrana celular e do citoesqueleto da célula hospedeira, um processo crítico para a sobrevivência e proliferação do parasito no interior da célula infectada. Embora reconhecidas por conterem diversas proteínas parasitárias, incluindo aquelas envolvidas na exportação de fatores de virulência e na remodelação da membrana da célula hospedeira, a composição molecular exata e a função integral das fendas de Maurer ainda não foram completamente decifradas (Bekić & Kilian, 2023; Jonsdottir, Counihan, et al., 2021).

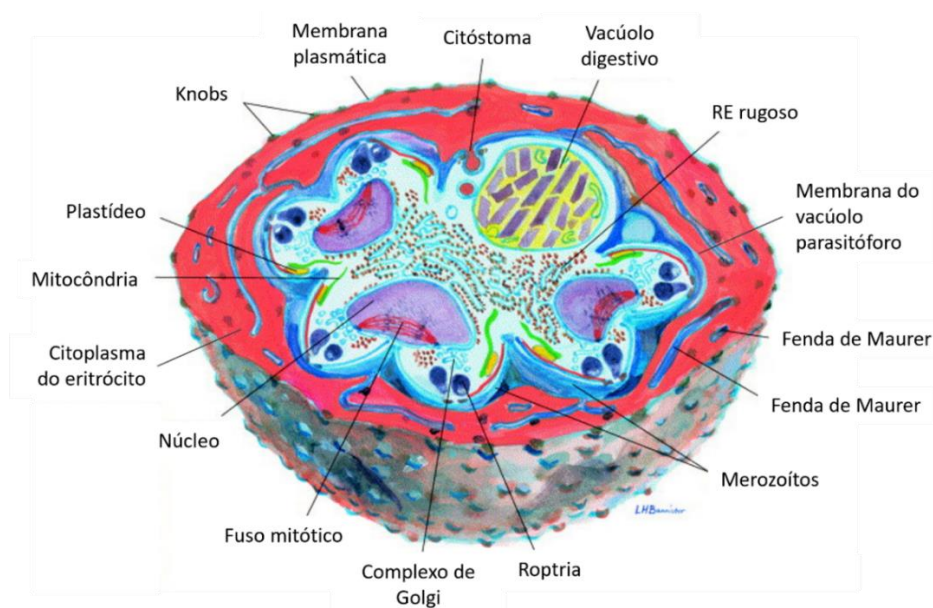


Figura 4. Morfologia do estágio esquizonte de *P. falciparum*. Ilustração esquemática da organização do esquizonte de *P. falciparum* no final de seu desenvolvimento intraeritrocitário, em uma hemácia seccionada transversalmente. Observam-se estruturas do hospedeiro, como as fendas de Maurer (classificadas como longas e curtas) e os knobs na superfície da membrana. Merozoítos em brotamento partem da periferia do esquizonte, com organelas apicais em formação no ápice. Mitocôndrias (verde) e plastídeos (amarelo) migram para essas células-filhas em desenvolvimento. Modificado da fonte: (Bannister et al., 2000)

1.3. O proteoma do *P. falciparum*

A espectrometria de massa de alta performance tem desempenhado um papel crucial na análise do proteoma de *P. falciparum*. Pesquisas detalhadas revelam que a expressão gênica é rigidamente controlada e sincronizada com as demandas funcionais do parasito em cada fase de seu ciclo de vida, sugerindo uma forte conexão entre a regulação gênica e a síntese proteica (Bozdech, Llinás, et al., 2003; Le Roch et al., 2003). Além disso, o proteoma de estágios como esporozoítos, merozoítos, trofozoítos e gametócitos foi amplamente caracterizado (Bozdech, Zhu, et al., 2003;

Florens et al., 2002). No caso específico da cepa 3D7 de *P. falciparum*, foram identificadas 5.389 proteínas combinando todos os estádios, catalogadas na base de dados “*Database for Plasmodium Species*” (PlasmoDB) (Aurrecochea et al., 2009; Bahl, 2003; Carucci et al., 2002).

O proteoma do esporozoíto apresenta diferenças significativas em relação aos demais estágios do *Plasmodium*, com cerca de 10% das proteínas sendo exclusivas dessa fase. Meerstein-Kessel e colaboradores documentaram uma considerável variabilidade nas proteínas esporozoíticas, particularmente aquelas específicas dessa fase, que são responsáveis por induzir a resposta imunológica no hospedeiro humano. Por meio de uma análise bayesiana integrada de dados transcriptômicos e proteômicos de 26 estudos, os autores identificaram 975 genes, dos quais 90 são exclusivos da fase esporozoítica de *P. falciparum*. Entre essas proteínas, destacam-se componentes envolvidos na síntese de ácidos graxos do tipo II no apicoplasto e na síntese de âncoras de glicosilfosfatidilinositol, sugerindo uma atividade metabólica restrita às glândulas salivares do mosquito. Apesar da variabilidade genética, os autores identificaram nove proteínas esporozoíticas relativamente bem conservadas, as quais são responsáveis por desencadear a resposta humoral e podem servir como marcadores de exposição prévia à infecção por *Plasmodium* (Meerstein-Kessel et al., 2021). Em contrapartida, os estágios de trofozoítos, merozoítos e gametócitos apresentam menos proteínas únicas, compartilhando uma maior proporção do proteoma total. As proteínas mais comuns em múltiplos estágios incluem elementos de manutenção celular, tais como proteínas ribossômicas, fatores de transcrição, histonas e componentes do citoesqueleto. Portanto, os esforços científicos têm se concentrado nesses estados intraeritrocitários (Florens et al., 2002).

1.4. Biologia do eritrócito e alterações induzidas por *P. falciparum*

Durante a fase intra-eritrocitária, o parasito induz intensa atividade metabólica, resultando em modificações conformacionais destinadas à captação de nutrientes e à adaptação ao ambiente intracelular. O parasito promove rearranjos estruturais profundos no eritrócito hospedeiro (ecinocitose), tais como modificação de proteínas e lipídios da membrana, inserção de proteínas parasitárias na membrana eritrocitária, incremento da rigidez e da permeabilidade celulares, bem como perturbações nos sistemas de transporte de metabólitos (Craig, 2001; Lee et al., 2019). Tais alterações favorecem a sobrevivência intracelular do parasito, facilitando a aquisição de

nutrientes e a excreção de subprodutos metabólicos. Além disso, determinados mecanismos induzidos conferem evasão imunológica ao parasito, mediante processos de adesão, sequestro e variação antigênica (Jónsdóttir et al., 2021).

1.4.1. Proteínas da membrana de eritrócitos e invasão parasitária

A invasão dos eritrócitos pelo *P. falciparum* é uma etapa crucial do seu ciclo biológico, ocorrendo durante a fase sanguínea assexuada da infecção. Este processo é uma série de eventos coordenados e sequenciais, altamente regulados por sinais internos e externos ao parasito, culminando no seu estabelecimento dentro do vacúolo parasitóforo. A compreensão detalhada destes mecanismos e das proteínas envolvidas, incluindo as do eritrócito hospedeiro, é fundamental e tem sido objeto de estudos extensivos. O processo de invasão pode ser decomposto em uma sequência coordenada de etapas, conforme ilustrado adiante.

1.4.1.1. Contato inicial e reorientação apical

A invasão do *Plasmodium falciparum* inicia-se com o contato entre o merozoíto e a superfície do eritrócito, mediado principalmente pelas proteínas MSP (merozoite surface proteins), como a MSP1, que estão presentes na superfície do parasito (Alaganan et al., 2017; Alruwaili et al., 2024). Essas interações iniciais, embora múltiplas e de baixa afinidade, permitem a adesão do parasito a diversos receptores eritrocitários (Boyle et al., 2013). Após o contato inicial, o merozoíto se reorienta, com seu polo apical, contendo micronemas e roptrias, voltado para a membrana do eritrócito. Este passo é crucial para a invasão (Cowman et al., 2017).

A Basigin (CD147), um receptor eritrocitário, desempenha papel central nesse ancoramento apical ao se ligar ao complexo RH5 (reticulocyte binding protein homologue 5), CYRPA (cysteine-rich protective antigen) e RIPR (Rh5 interacting protein) ou “complexo RCR” do parasito, indispensável para a invasão, independentemente da cepa de *P. falciparum*, e constitui um ponto de controle crítico no processo invasivo (L. Chen et al., 2017; Farrell et al., 2024; Scally et al., 2022; Volz et al., 2016).

Estudos recentes revelaram que as proteínas CSS (cysteine-rich small secreted protein) e TRAMP (thrombospondin-related apical membrane protein) formam um complexo que se associa diretamente ao complexo RCR, tendo a estrutura de CSS sido recentemente elucidada (Scally et al., 2022). A interação funcional entre RIPR,

CSS e TRAMP foi inicialmente caracterizada em *P. knowlesi*, onde essas proteínas também se revelaram essenciais para a invasão eritrocitária (Knuepfer et al., 2019).

A interação funcional entre RIPR, CSS e TRAMP foi elucidada por criomicroscopia eletrônica (**Figura 5**), que também demonstrou que RH5 adota uma conformação rígida, contrariando modelos anteriores (Aniweh et al., 2017; Farrell et al., 2024). Adicionalmente, anticorpos neutralizantes contra CYRPA impedem a ligação do complexo RCR ao eritrócito, sendo mais eficazes quando os epítomos estão orientados para a membrana (Farrell et al., 2024; Ragotte et al., 2020; Williams et al., 2024).

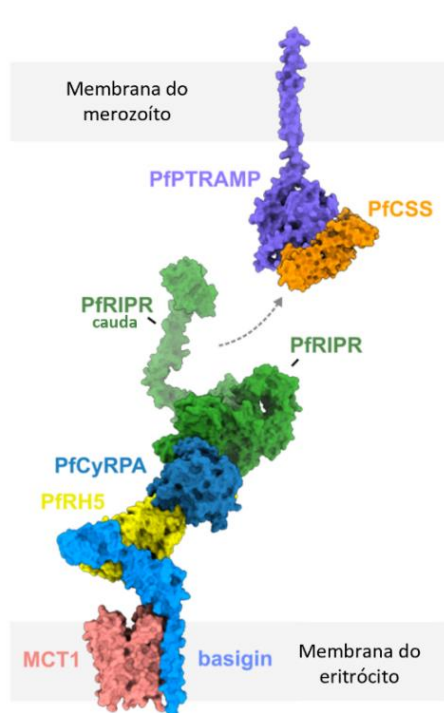


Figura 5. Modelo integrado do complexo *PfrCR* no eritrócito. Representação esquemática ilustrando a organização espacial do complexo RCR (RH5–CYRPA–RIPR) durante a interação com a célula hospedeira. A cauda da proteína RIPR é mostrada estendendo-se até a membrana do merozoíto, onde se localiza o complexo CSS–TRAMP, implicado na ancoragem do merozoíto à superfície eritrocitária. Modificado da fonte: (Farrell et al., 2024)

Outros receptores eritrocitários, como GYPA, GYPB, GYPC (Glycophorin A, B, C) e o CR1 (Complement Receptor 1), também interagem com ligantes do parasito durante a invasão (Jaskiewicz et al., 2019; Mayer et al., 2009).

A interação entre EBA175 (erythrocyte binding antigen 175) e GYPA é uma das mais bem caracterizadas, sendo EBA175 secretada dos micronemas do parasito e reconhecendo resíduos de ácido siálico na GYPA, induzindo a adesão e deformação

da membrana do eritrócito. EBA140 e EBL1 (erythrocyte binding like protein 1) também reconhecem GYPC e GYPB, respectivamente, modificando a rigidez e a tensão do citoesqueleto, facilitando a penetração do parasito (Jaskiewicz et al., 2019; Mayer et al., 2009; Tolia et al., 2005). Além disso, a descoberta do papel de DAF/CD55 (Complement decay-accelerating factor) como receptor necessário para a invasão sublinha a complexidade das interações receptor-ligante e sugere que múltiplas vias redundantes são usadas pelo parasito (Shakya et al., 2021).

1.4.1.2. Formação da união estreita

Uma etapa crítica é o estabelecimento da união estreita, mediada por interações de alta afinidade entre a proteína AMA1, presente na superfície do parasito (Riglar et al., 2011), e o RON2 (rhoptry neck protein 2), previamente inserido na membrana eritrocitária (Srinivasan et al., 2011). Essa junção assume forma anular e mantém íntima aproximação entre as membranas do parasito e da célula hospedeira. A penetração do parasito é impulsionada por um motor de actina-miosina, que desloca a união estreita do polo apical ao posterior do merozoíto, promovendo sua internalização. Durante esse processo, ocorre a liberação de íons cálcio dos compartimentos intracelulares do parasito, ativando quinases dependentes de cálcio (CDPK1) e desencadeando a secreção coordenada de proteínas dos micronemas e roptrias. Inicialmente, proteínas de micronema como a EBA175 são secretadas, seguidas por proteínas da roptria, como o complexo RON, TRAMP e CLAG (cytoadherence linked asexual protein 2) (Alaganan et al., 2017). A secreção de RON3, visualizada sobre a membrana invaginada durante a internalização, indica a liberação simultânea de lipídios pelas roptrias. Essa liberação é acompanhada pela desestabilização do citoesqueleto eritrocitário no local da interação (Geoghegan et al., 2021).

Um evento marcante nesse estágio é o desprendimento “*shedding*” da camada superficial do merozoíto, incluindo diversas proteínas de superfície de merozoítos e antígeno repetitivo de serina (como MSP1, MSP3, MSP7, SERA4, SERA5), no ponto de progressão da união estreita, o que parece ser necessário para romper as interações ligante-receptor e permitir a continuidade da invasão. Entretanto, estudos recentes demonstram que esse processo não é universal, já que proteínas como MSP2 e MSP4 não são eliminadas, mas sim internalizadas juntamente com o parasito (Boyle et al., 2014).

1.4.1.3. Internalização do merozoíto

À medida que a união estreita se desloca, a membrana do eritrócito envolve o merozoíto, formando o vacúolo parasitóforo, delimitada por membrana. O parasito é então completamente englobado por essa estrutura remodelada. Estudos de microscopia de luz em folha de luz em 4D demonstraram que a membrana do vacúolo parasitóforo é predominantemente derivada da membrana do eritrócito (Geoghegan et al., 2021). A redução da área de superfície eritrocitária correlaciona-se com a área estimada da membrana do vacúolo parasitóforo. O colesterol é ativamente recrutado para o sítio de invasão desde os estágios iniciais, e sua concentração local, associada à sua curvatura negativa intrínseca, pode contribuir para estabilizar as intensas deformações de membrana requeridas na invaginação (Brown et al., 2020). A depleção de colesterol inibe eficientemente a invasão. A força gerada pelo motor actina-miosina do parasito dirige esse processo de internalização. A fusão entre membranas do merozoíto e hospedeiro pode representar um mecanismo energeticamente vantajoso para entrega localizada de lipídios à membrana eritrocitária, contribuindo também para o fechamento da invaginação.

1.4.2. Modulação do microambiente intracelular.

Após invadir o eritrócito, o *Plasmodium* remodela radicalmente a membrana da célula hospedeira para estabelecer vias de permeabilidade essenciais à sua sobrevivência (Warncke & Beck, 2019). Este processo, mediado por complexos moleculares especializados, permite a captação de nutrientes (como glicose, aminoácidos e nucleosídeos) e eliminação de resíduos (como lactato e íons de hidrogênio) através de vias iônicas específicas. Esta alteração fundamental na permeabilidade do eritrócito infectado é um alvo terapêutico em investigação, uma vez que a sua interrupção compromete severamente o desenvolvimento intraeritrocítico do parasito.

1.4.2.1. Permeabilidade do eritrócito e captação de nutrientes

Após a invasão do eritrócito, o *Plasmodium* induz uma remodelação funcional significativa na membrana da célula hospedeira, aumentando sua permeabilidade para viabilizar a captação de nutrientes essenciais e a eliminação de resíduos metabólicos. A proteína RHOPH3 é crucial nesse processo, desempenhando um papel coordenado tanto na invasão do eritrócito quanto na ativação das novas vias de permeabilidade (NPP). Além disso, outras proteínas da roptria colaboram para a

modulação da célula hospedeira e a aquisição de nutrientes necessários para a sobrevivência do parasito (Counihan et al., 2013; Zuccala et al., 2012).

O complexo formado pelas proteínas RHOPH1, RHOPH2 e CLAG3 é exportado para o citoplasma do eritrócito, onde contribui para a formação do canal aniônico da superfície plasmodial (Plasmodial Surface Anion Channel – PSAC), essencial para a absorção de solutos que sustentam a sobrevivência do parasito (Ahmad et al., 2020; Counihan et al., 2017; Nguitragool et al., 2011). As proteínas RHOPH2 e RHOPH3 são fundamentais para a aquisição de nutrientes por meio de NPP ativados após a entrada do parasita, desempenhando um papel decisivo no crescimento e replicação intraeritrocitária (Ito et al., 2017; Sherling et al., 2017). Experimentos de silenciamento gênico (*knockdown*) demonstraram que a depleção de RHOPH3 compromete o ciclo assexuado do parasito, afetando simultaneamente os processos de invasão e desenvolvimento intracelular (Ito et al., 2017; Sherling et al., 2017).

Estudos funcionais identificaram o CLAG3 como a única proteína do PSAC com uma região exposta na superfície eritrocitária, sendo altamente conservada entre as espécies de *Plasmodium*, o que indica sua importância evolutiva e funcional na fisiopatologia do parasito (Ito et al., 2017; Shao, 2022). Mutações no gene *clag3*, como a substituição A1210T em um domínio transmembranar anfipático, alteram a seletividade do canal e conferem resistência ao inibidor de cisteíno-proteases leupeptina, evidenciando o papel estrutural do CLAG3 na permeabilidade induzida pelo parasito (P. Sharma et al., 2015).

Estudos bioquímicos indicam que o CLAG3 pode formar oligômeros na membrana do eritrócito. A coexpressão de diferentes isoformas resulta em fenótipos de canais com permeabilidades intermediárias, sugerindo que a composição do oligômero regula quantitativamente a atividade do PSAC. Esses achados ressaltam o papel central de CLAG3 na modulação dos canais de nutrientes críticos para o desenvolvimento intraeritrocitário de *P. falciparum* (Gupta et al., 2018).

1.4.2.2. Exportação de proteínas para o eritrócito hospedeiro

Durante a infecção intraeritrocitária, *P. falciparum* exporta centenas de proteínas para o citoplasma do eritrócito, induzindo modificações estruturais e funcionais significativas na célula hospedeira. Esse processo é mediado por mecanismos especializados de reconhecimento, processamento e translocação, que garantem a entrega precisa das proteínas parasitárias (**Figura 6**) (Crabb et al., 2010).

A exportação de proteínas para o eritrócito requer um sinal específico, denominado elemento de exportação de *Plasmodium* (Plasmodium export element – PEXEL), também conhecido como motivo de direcionamento ao hospedeiro (Host targeting – HT). Este motivo, presente na maioria das proteínas exportadas, é clivado pela plasmepsina V, uma aspartil-protease associada ao complexo SEC61–SEC62–SPC25 (secretory complex protein 61, 62 – signal peptidase complex 25). A clivagem ocorre entre os resíduos 3 e 4 (RxL↓xE/Q/D), gerando a forma madura da proteína, com xE/Q/D na extremidade N-terminal, apta para exportação (Marapana et al., 2018).

A posição conservada do PEXEL, localizada entre 15 e 30 resíduos após a sequência sinal, facilita seu processamento cotraducional (Boddey et al., 2016). No entanto, a excisão do PEXEL também ocorre em proteínas não exportadas, como UIS2 (serine/threonine protein phosphatase), RON11 (rhoptry neck protein 11) e PMIX (plasmepsin IX), indicando que clivagem e exportação são processos distintos (van Ooij et al., 2008). O resíduo N-terminal gerado pela clivagem desempenha um papel importante na exportação, com ácido aspártico e fenilalanina atuando como inibidores, o que amplia o papel da plasmepsina V (Fierro et al., 2024; Gabriela et al., 2024).

Para atravessar a membrana do vacúolo parasitóforo, as proteínas devem passar por um complexo proteico especializado, denominado PTEX (Plasmodium Translocon of Exported Proteins), composto por três proteínas centrais EXP2–HSP101–PTEX150, além de duas proteínas auxiliares, PTEX88 e TRX2 (thioredoxin 2) (De Koning-Ward et al., 2009; K. Matthews et al., 2013; Matz et al., 2013), e pela proteína de superfície ancorada em GPI (glicosilfosfatidilinositol), P113 (surface protein) (Elsworth et al., 2016).

A translocação requer o desdobramento prévio das proteínas, sendo todos os componentes do PTEX essenciais para a sobrevivência do parasito (Elsworth et al., 2014). A proteína HSP101 (heat shock protein 101) atua como uma chaperona, reconhecendo proteínas com PEXEL no retículo endoplasmático e mediando seu transporte até o vacúolo parasitóforo, independentemente da clivagem do motivo PEXEL. A montagem funcional do PTEX depende da interação entre EXP2 e PTEX150, formando um subcomplexo estável que ancora HSP101 (Crabb et al., 2010; Gabriela et al., 2022; Jonsdottir, Gabriela, et al., 2021).

Além do PTEX, o complexo EPIC (Exported Protein-Interacting Complex), formado por PV1, PV2 (parasitophorous vacuolar protein 1, 2) e EXP1, interage funcionalmente com o PTEX e pode atuar na preparação das proteínas para

translocação. Proteínas como *PfEMP1* são exportadas sem inserção prévia na membrana do vacúolo; após atravessar a membrana do vacúolo parasitóforo, são reconhecidas por chaperonas do hospedeiro, como o complexo TRiC (TCP1 Ring Complex), e encaminhadas as fendas de Maurer, estruturas intermediárias de triagem no citoplasma do eritrócito (Batinovic et al., 2017).

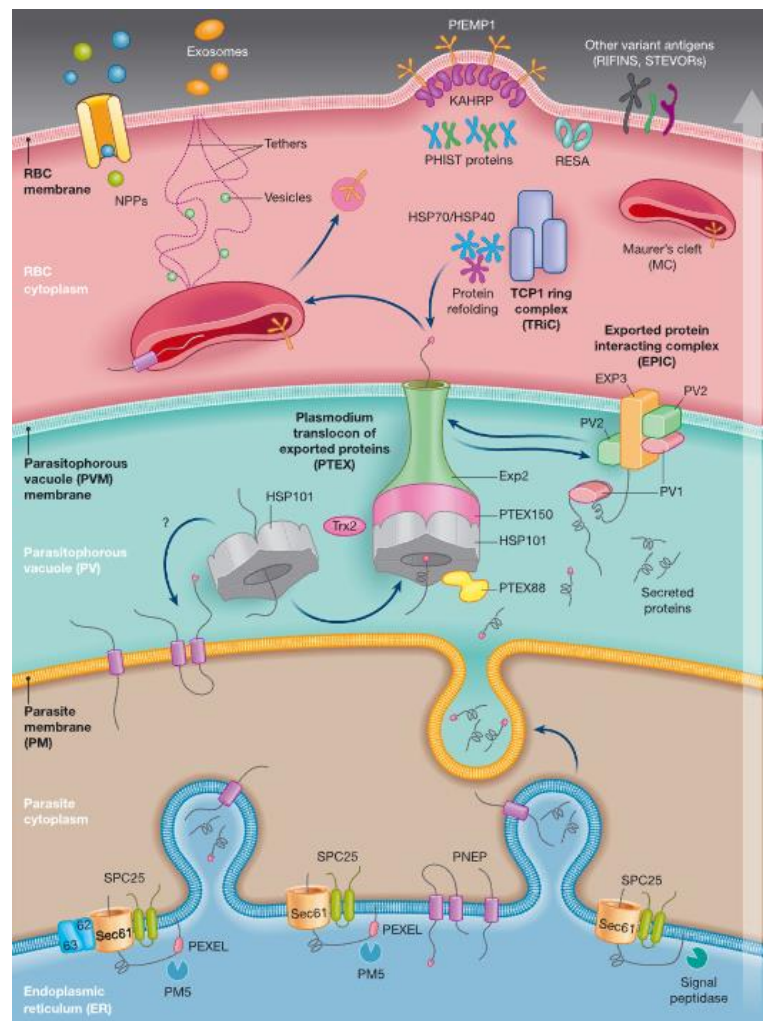


Figura 6. Modelo de direcionamento de proteínas PEXEL para o translocon vacuolar. As proteínas destinadas à exportação contêm uma sequência sinal seguida pelo motivo PEXEL, clivado pela plasmepsina V no retículo endoplasmático (RE), gerando a forma madura. HSP101 atua como chaperona no RE e no vacúolo parasitóforo (PV), onde as proteínas atravessam a membrana vacuolar via o complexo PTEX. O complexo EPIC também participa da preparação para a translocação. Além da via canônica, propõe-se uma rota alternativa mediada por SEC61 e SPC25. Fonte: (K. M. Matthews et al., 2019)

A remodelação do eritrócito por *P. falciparum* depende de forma significativa desse sistema exportador, com cerca de 10% do proteoma do parasito composto por proteínas exportadas, incluindo as proteínas PEXEL-negativas (PNEP). Finalmente,

foi proposta uma via alternativa menos complexa, mediada pelos complexos SEC61 e SPC25, que difere funcionalmente do complexo de secreção canônico (Marapana et al., 2018; Schulze et al., 2015; Tuteja, 2007).

1.4.3. Citoaderência ao endotélio pelos eritrócitos infectados.

Durante a maturação do *P. falciparum*, ocorre uma série de modificações morfológicas e estruturais no eritrócito infectado, que afetam suas propriedades reológicas e adesivas (Crabb et al., 1997; Helms et al., 2016). A célula hospedeira adquire uma forma mais esférica e pode apresentar protruções eletrondensas, denominadas *knobs* (Ling et al., 2003). A formação e manutenção dessas estruturas dependem da interação da proteína KAHRP (knob-associated histidine-rich protein) com componentes do citoesqueleto eritrocitário, como α -espectrina e anquirina R, o que reorganiza o citoesqueleto submembranar e confere rigidez à célula infectada (Weng et al., 2014). Essas protruções estão diretamente ligadas à adesão do eritrócito ao endotélio, sendo que mutações ou deleções em KAHRP resultam em *knobs* defeituosos e redução da citoaderência (Rug et al., 2006).

Além de estabilizar os *knobs*, KAHRP interage com a região citoplasmática da proteína PfEMP1 (Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1), ancorando-a na membrana do eritrócito e permitindo sua exposição na superfície celular (Lover et al., 2018; K. L. Waller et al., 1999; Wisner, 2023). A expressão superficial de PfEMP1 está correlacionada com a adesão dos eritrócitos infectados ao endotélio (Senczuk et al., 2001). A exposição adequada de PfEMP1 depende da ação de outras proteínas exportadas pelo parasito, como SBP1 (skeleton-binding protein 1) e MAHRP1 (membrane associated histidine-rich protein 1), localizadas nas fendas de Maurer. A ausência de SBP1 compromete o transporte de PfEMP1 até a membrana do eritrócito, sem afetar a morfologia das fendas, indicando sua função específica na translocação da proteína (Cooke et al., 2006). A deleção de MAHRP1, por outro lado, impede a exposição de PfEMP1 na superfície e, conseqüentemente, a adesão ao endotélio (Spycher et al., 2008).

Outra proteína relevante é MESA (mature parasite-infected erythrocyte surface antigen, também conhecida como PfEMP2), uma proteína que interage com a proteína 4.1 do citoesqueleto eritrocitário. Estudos indicam que a ausência de MESA ou da proteína 4.1 não compromete significativamente a adesão dos eritrócitos infectados,

mas pode afetar a viabilidade do parasito dentro do ambiente intracelular (Black et al., 2008; Magowan et al., 1995; K. L. Waller et al., 2003).

A adesão dos eritrócitos infectados ao endotélio é mediada principalmente pela interação entre *PfEMP1* e vários receptores endoteliais humanos, como CD36 (platelet glycoprotein 4), ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1), VCAM1 (vascular cell adhesion protein 1), E-selectina, PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule), sulfato de condroitina A (CSA) e ácido hialurônico, o que garante o sequestro das formas sanguíneas maduras em leitos microvasculares hipoxêmicos, evitando sua depuração esplênica (Carvalho et al., 2013; Pasloske & Howard, 1994; Senczuk et al., 2001; Spadeto et al., 2022; Suurbaar et al., 2022). A força dessas interações sob fluxo circulatório sustenta altos níveis parasitários e está associada à gravidade clínica da malária.

A *PfEMP1* origina-se de uma família altamente polimórfica de ~60 genes var, cada um expresso de forma mutuamente exclusiva, gerando variação antigênica rápida que dificulta o reconhecimento imune (Flick & Chen, 2004; Gardner et al., 2002; Rask et al., 2010). Diferentes domínios de ligação às células hospedeiras conferem especificidade funcional; variantes que reconhecem ICAM1, por exemplo, associam-se mais frequentemente à malária cerebral (Adams et al., 2021). enquanto aquelas que se ligam predominantemente a CD36 tendem a quadros menos graves (Newbold et al., 1997).

A sequestração microvascular resulta em obstrução hemodinâmica, hipóxia tecidual e inflamação local. No cérebro, esses eventos levam à ruptura da barreira hematoencefálica, edema e disfunção neurológica, características da malária cerebral, a complicação mais letal da infecção (Pasloske & Howard, 1994). Embora a adesão não cause lise eritrocitária direta, ela prolonga o ciclo intraeritrocitário, criando um nicho protegido que favorece altas densidades parasitárias e agrava a anemia, acidose e falência multiorgânica.

Dado o papel central de *PfEMP1* na patogênese, estratégias vacinais estão sendo desenvolvidas para focar em domínios conservados ou variantes fortemente associadas a formas graves de malária. Ensaio recentes demonstraram que diferentes perfis de *PfEMP1* induzem respostas transcricionais divergentes no endotélio, o que destaca a necessidade de imunógenos multivalentes que englobem a diversidade funcional da família (Othman et al., 2023). O desafio está em combinar ampla cobertura antigênica com a minimização de respostas cruzadas indesejáveis,

de modo a neutralizar a citoaderência sem induzir autoimunidade ou selecionar variantes de escape.

Outras proteínas do *P. falciparum*, inseridas na membrana da célula hospedeira, também desempenham papéis significativos na variação antigênica, sendo assim fatores-chave de virulência. A seguir, são descritas algumas dessas proteínas, que estão expostas na superfície dos eritrócitos infectados.

RIFINs (Repetitive interspersed families of polypeptides): A família RIFIN é composta por uma vasta gama de proteínas variantes clonais codificadas por aproximadamente 150-200 genes rif. Estas proteínas são cruciais na patogênese da malária grave (Goel et al., 2015; Kyes et al., 1999). As RIFINs facilitam a adesão de eritrócitos infectados às células hospedeiras, especialmente na formação de rosetas, fenômeno que está fortemente associado à malária grave. Além disso, as RIFINs têm sido identificadas como ligantes para a opsonização de eritrócitos infectados, sugerindo seu papel na mediação da supressão imunológica (Kanoi et al., 2020).

STEVARs (sub-telomeric variable open reading frame): Codificadas por cerca de 40 genes, as proteínas da família STEVAR são expressas tanto nos estágios assexuados quanto nos sexuais do ciclo de vida do *Plasmodium*. Essas proteínas desempenham um papel importante na adesão de eritrócitos infectados às células hospedeiras, além de estarem implicadas na supressão imunológica (Bachmann et al., 2015). Anticorpos específicos contra STEVARs têm demonstrado potencializar a aglutinação e reduzir a carga de eritrócitos infectados em modelos in vivo (Naissant et al., 2016; Witmer et al., 2012).

SURFINs (surface-associated interspersed proteins): Codificadas pelos genes *surf*, as proteínas SURFIN são expressas nos eritrócitos infectados e nos merozoítos, e estão localizadas ao lado da *PfEMP1* e das RIFINs. Desempenham um papel crucial na adesão dos eritrócitos infectados e são alvos da imunidade adquirida naturalmente. A presença de anticorpos específicos contra SURFINs tem mostrado reduzir a carga parasitária *in vivo*, embora a diversidade estrutural dessas proteínas represente desafios para o desenvolvimento de vacinas eficazes (Kanoi et al., 2020; Mphande et al., 2008; Rask et al., 2010).

MC-2TM (Maurer's cleft two transmembrane protein): As proteínas MC-2TM possuem uma topologia de duas regiões transmembranas e estão associadas à membrana do parasito, desempenhando um papel fundamental na patogenicidade e na evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, as MC-2TM estão

envolvidas na variação antigênica e no sequestro das hemácias infectadas. A associação dessas proteínas à membrana do eritrócito é distinta das proteínas RIFIN e STEVOR, as quais também são importantes na patogenicidade da malária (Bachmann et al., 2015; Yadavalli et al., 2021).

Essas proteínas, com suas funções e variação antigênica, desempenham papéis cruciais na evasão do sistema imunológico do hospedeiro, promovendo a sobrevivência e disseminação do *Plasmodium* durante a infecção. A compreensão detalhada dessas interações oferece insights importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e vacinais contra a malária.

1.4.4. Egresso dos merozoítos do eritrócito

Durante a replicação intraeritrocitária, *P. falciparum* libera os merozoítos do eritrócito em um processo crucial para a propagação da infecção. O egresso, que envolve a ruptura sequencial das membranas que cercam o parasito, é mediado por uma cascata de sinais. A ativação da GCalpha (guanylyl cyclase alpha) ocorre por um mecanismo alternativo desconhecido, distinto daquele observado em mamíferos, e é um regulador crítico da PKG (cGMP-dependent protein kinase), que inicia a sinalização, elevando os níveis intracelulares de cálcio e ativando proteínas chave, como a CDPK5 (calcium-dependent protein kinase 5), que facilitam a liberação de organelas, como os exonemas, micronemas e roptrias (Absalon et al., 2018; Alam et al., 2015; Nofal et al., 2021).

Com a ativação da cascata de sinalização, o parasito promove a exocitose de organelas apicais, incluindo exonemas, micronemas e roptrias, que contêm proteínas efetoras essenciais para o egresso e à subsequente invasão. A SUB1 (subtilisin-like protease 1), dependente de cálcio e regulada por redox, é liberada dos exonemas para o lúmen do vacúolo parasitóforo próximo ao momento do egresso, processa os antígenos SERA (serine repeat antigen), essenciais para a ruptura das membranas (Mukherjee et al., 2023; Ruecker et al., 2012; Sanders et al., 2007).

A protease aspártica plasmepsina X (PMX) desempenha também um papel essencial, regulando a atividade de diversas proteínas efetoras envolvidas no egresso (Nasamu et al., 2017). A PMX cliva substratos de micronemas e exonemas antes da liberação, enquanto os substratos de roptrias são processados após a descarga desses compartimentos (Mukherjee et al., 2022).

A ruptura das membranas representa o evento terminal do egresso do parasito. Inicialmente, a poração precede a ruptura da membrana do vacúolo parasitóforo, acompanhada pelo colapso do citoesqueleto do eritrócito hospedeiro, facilitada por proteases como SUB1. Componentes do PTEX, localizado na membrana e essencial para a exportação de proteínas parasitárias, também estão implicados nesse processo. EXP2, um canal de nutrientes na membrana do vacúolo, pode participar da permeabilização durante o egresso (Garten et al., 2018). EXP1, igualmente presente na membrana, contribui para a absorção de nutrientes (Nessel et al., 2020).

Após a ruptura da membrana do vacúolo parasitóforo, os merozoítos ficam expostos ao citoplasma do eritrócito. A lise subsequente da membrana do eritrócito requer a exocitose de vesículas especializadas. Em gametócitos, essas vesículas contêm a proteína tipo perforina (PLP2). A PLP2 demonstrou capacidade de permeabilizar a membrana durante o egresso de gametócitos (Deligianni et al., 2013; Wirth et al., 2014). Embora a maioria dos estudos tenha foco em merozoítos, o mecanismo do egresso e a atuação de proteínas tipo perforina na ruptura da membrana parecem ser conservados entre estágios (Garg et al., 2020).

Em conjunto, o egresso do *P. falciparum* do eritrócito é um processo altamente regulado que envolve uma complexa rede de sinais, proteases, quinases, fosfolipases e proteínas exportadas que remodelam a célula hospedeira. A elucidação funcional das proteínas envolvidas, sobretudo aquelas que atuam sobre a membrana do eritrócito, representa uma via promissora para o desenvolvimento de novas terapias antimaláricas direcionadas à interrupção desse passo vital.

1.5. Estratégias terapêuticas

O desenvolvimento de intervenções eficazes contra *P. falciparum* é um desafio significativo devido à complexidade de seu ciclo de vida e à sua notável capacidade de evadir o sistema imunológico. Estudos sobre proteínas imunogênicas indicam que cerca de 40% dessas proteínas são expressas na membrana do parasito ou nos eritrócitos do hospedeiro, destacando a superfície celular como um alvo estratégico para a resposta imunológica (Crompton et al., 2010).

O *P. falciparum* utiliza extensas famílias de multigenes, como *var*, *rif* e *stevor*, para codificar antígenos de superfície variantes. Essa variabilidade antigênica dificulta o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz, uma vez que as variantes de antígenos podem escapar do reconhecimento imunológico (Wahlgren et al., 2017). O

enfrentamento dessa evasão imunológica apresenta desafios consideráveis: a imunidade natural se desenvolve de forma gradual, após anos de exposição repetida ao parasito, e as respostas de anticorpos em crianças tendem a ser de curta duração (Crompton et al., 2014). Além disso, a resistência a medicamentos, como a associada à proteína PfCRT (responsável pela resistência à cloroquina), agrava ainda mais a dificuldade no tratamento (Kim et al., 2019).

A diversidade genética observada em regiões-chave de proteínas alvo para vacinas, como PfCSP, também limita a eficácia de vacinas baseadas em cepas únicas (por exemplo, RTS,S/AS01 e R21/Matrix-M). A alta polimorfia nas regiões Th2R e Th3R dessas proteínas reduz a correspondência com os haplótipos vacinais, comprometendo a eficácia das vacinas desenvolvidas.

Esse panorama revela a magnitude dos esforços necessários para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que devem ser intensificados para enfrentar os desafios impostos pela evasão imunológica e pela resistência a medicamentos.

1.5.1. Antimaláricos utilizados para o tratamento da malária

A cloroquina, um derivado da quinolina 4-amino, manteve-se por décadas como o pilar do tratamento da malária não complicada, especialmente em infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*. Seu mecanismo de ação principal consiste na acumulação no vacúolo digestivo do parasito, onde inibe a polimerização do heme tóxico, impedindo sua detoxificação e induzindo estresse oxidativo letal ao *Plasmodium* (Slater, 1993). No entanto, a ampla disseminação de mutações nos genes *pfcr1* e *pfmdr1* (Nomura et al., 2001), especialmente em *P. falciparum*, resultou na emergência global de resistência, comprometendo substancialmente sua eficácia terapêutica, principalmente em regiões endêmicas da África e Sudeste Asiático (WHO, 2024). Apesar disso, a cloroquina continua sendo recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o tratamento de malária por *P. vivax* em áreas onde a sensibilidade é mantida, particularmente nas Américas (WHO, 2024).

Em contraste com a cloroquina, a artemisinina —originalmente isolada da planta *Artemisia annua*— emergiu como a terapia de escolha para a malária, particularmente em contextos de resistência a antimaláricos convencionais. Seu mecanismo de ação baseia-se na ativação por íons ferro heme intraparasitários, o que gera espécies reativas de oxigênio e radicais livres capazes de alquilar proteínas

essenciais e danificar estruturas celulares, como lipídios e ácidos nucleicos (Golenser et al., 2006; Zheng et al., 2024). Essa ação rápida e eficaz contra todas as formas assexuadas do parasito justifica sua inclusão em terapias combinadas baseadas em artemisinina (ACTs), atualmente recomendadas como padrão-ouro pela OMS para o tratamento da malária não complicada. Contudo, a emergência de resistência parcial —mediada por mutações no gene *kelch13* e associada a fenótipos de quiescência parasitária— constitui uma ameaça crescente à sua eficácia (Ouji et al., 2018; Rosenthal et al., 2024).

A mefloquina, derivada da quinolina sintética, foi desenvolvida como alternativa à cloroquina em contextos de resistência. Seu efeito esquizonticida sanguíneo parece decorrer da interferência no metabolismo do heme no vacúolo digestivo do parasito, embora seu mecanismo molecular exato ainda não tenha sido totalmente elucidado (Yadav et al., 2025). A mefloquina apresenta alta eficácia tanto no tratamento quanto na profilaxia da malária, especialmente em regiões com resistência consolidada à cloroquina. No entanto, seu uso é limitado por um perfil de segurança neuropsiquiátrico desfavorável, com relatos bem documentados de efeitos adversos, como ansiedade, depressão, distúrbios do sono, alucinações e, em casos raros, convulsões (Cameron Ritchie et al., 2013). Esses riscos exigem uma avaliação criteriosa do histórico psiquiátrico dos pacientes antes da prescrição, especialmente em populações vulneráveis.

Finalmente, a primaquina, o único antimalárico clinicamente disponível com atividade contra os hipnozoítos hepáticos de *P. vivax* e *P. ovale*, desempenha um papel insubstituível na cura radical, prevenindo recidivas tardias (Shimizu et al., 2015). Sua ação está relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio que danificam os estágios latentes do parasito no fígado (Watson et al., 2017). No entanto, a primaquina é também um potente agente oxidante, e sua administração em indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) pode provocar hemólise aguda, potencialmente fatal (Luzzatto & Seneca, 2014). A G6PD, sendo a enzima-chave na via da pentose-fosfato responsável pela produção de NADPH, essencial para a manutenção da glutatona reduzida, é fundamental para a integridade dos eritrócitos frente ao estresse oxidativo. Diante disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda enfaticamente o rastreamento para deficiência de G6PD antes da administração de primaquina, com ajustes na dosagem ou a adoção de esquemas terapêuticos alternativos nos casos de deficiência confirmada (Recht et al., 2018).

1.5.2. Vacina contra *Plasmodium*: avanços e perspectivas

A interrupção eficaz da transmissão da infecção malárica pode ser alcançada através do desenvolvimento de uma vacina com desempenho ótimo, capaz de inibir a fase inicial do crescimento do patógeno no hospedeiro humano, bem como prevenir as fases subsequentes do ciclo de vida do parasito. Atualmente, há vários candidatos a vacina contra a malária em diferentes estágios de desenvolvimento, com alguns apresentando resultados promissores em ensaios clínicos.

O candidato a vacina contra a malária mais avançado é a vacina RTS,S/AS01 Mosquirix® (GlaxoSmithKline – GSK), tem como alvo a proteína circunsporozoíta (Circunsporozoite Surface Protein – CSP), uma molécula essencial e multifuncional que está ligada à membrana plasmática dos *Plasmodium* através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Wang et al., 2005) confirmado recente por espectrometria de massas (Nagar et al., 2024). A vacina é classificada como pré-eritrocítica, uma vez que direciona sua ação contra a CSP presente na superfície do esporozoíto. Ao fazer isso, a vacina é capaz de combater os parasitos antes mesmo de eles infectarem as células hepáticas (Duffy, 2022).

A RTS,S/AS01 é uma vacina recombinante monovalente desenvolvida contra *P. falciparum*, baseada em fragmentos da proteína circunsporozoíta (CSP) da cepa NF54. A formulação inclui as últimas 18 repetições NANP da CSP e sua região C-terminal, contendo epítomos de células T CD4+ e CD8+, tanto variantes quanto conservados. A formulação utiliza o adjuvante AS01E, que induz ativação transitória da imunidade inata e promove eficiente apresentação antigênica por células dendríticas nos linfonodos (Kaslow & Biernaux, 2015; Laurens, 2020). Ensaios clínicos demonstraram eficácia moderada, com redução de 25,9% a 36,3% na incidência de malária clínica após quatro doses (Nadeem et al., 2022; RTS, 2015).

Outra vacina promissora é R21/MM (Universidade de Oxford/Novavax Inc.), utiliza uma tecnologia de expressão de partículas recombinantes semelhantes ao vírus, em *Hansenula polymorpha*, assim como a RTS,S/AS01 compreende a repetição central C-terminal da CSP da cepa *P. falciparum* NF54 fundido ao N-terminal de HBsAg viral. Além disso, o adjuvante Matrix-M foi adicionado para melhorar a resposta imunológica da vacina contra a proteína circunsporozoíta (Duffy, 2022; Nadeem et al., 2022). Em estudos recentes, nenhuma das sequências de CSP de parasitos da Etiópia coincidiu com a dos haplótipos da vacina, o que ressalta a necessidade de

considerar a diversidade regional do parasito no desenvolvimento de futuras vacinas para maximizar sua eficácia (Mandefro et al., 2025).

Outras vacinas candidatas contra a malária que visam *P. falciparum*, como as vacinas ChAd63 RH5, MVA RH5, PEBS-POC1, ChAd63-METRAP, DNA-Ad, PfSPZ, p52-p36-GAP, ChAdOx1 LS2, entre outras, estão em desenvolvimento e ainda estão sendo testadas quanto à segurança e eficácia (Bonam et al., 2021; Duffy, 2022).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária seria uma arma crucial na luta contra o enorme impacto socioeconômico desta doença. As vacinas são amplamente reconhecidas como uma das ferramentas de saúde pública mais bem-sucedidas, e a busca por uma vacina eficaz contra a malária deve ser uma prioridade para a saúde pública global.

A expressão clonal e a diversidade estrutural das STEVORs dificultam o desenvolvimento de vacinas e terapêuticas eficazes, tornando-as potenciais alvos para imunização passiva, com necessidade de mais investigação para seu uso no controle da malária (Wahlgren et al., 2017).

1.6. Proteínas de membrana como alvos terapêuticos

As proteínas de membrana, que correspondem a aproximadamente 20–30% dos marcos de leitura abertos em um genoma, desempenham papéis centrais em processos celulares essenciais (Dobson et al., 2015; Uhlén et al., 2015). Devido à sua localização na superfície celular, estima-se que cerca de 55% dos fármacos atualmente aprovados pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (Food and Drug Administration – FDA) tenham essas proteínas de superfície como alvos terapêuticos em humanos (Bakheet & Doig, 2009; Overington et al., 2006; Yildirim et al., 2007). No entanto, o estudo dessas proteínas apresenta desafios consideráveis, principalmente devido às suas propriedades físico-químicas, que dificultam sua expressão, purificação e análise estrutural por métodos tradicionais (Bender & Schmidt, 2019).

Como já discutido anteriormente, *P. falciparum* promove intensa remodelação do eritrócito, exportando proteínas parasitárias que alcançam a superfície celular e desempenham papéis-chave na patogênese e evasão imune. A exposição dessas proteínas as torna alvos estratégicos para o desenvolvimento de vacinas e terapias antimaláricas (Waweru et al., 2023).

1.7. Métodos de enriquecimento e isolamento de proteínas de membrana

1.7.1. Estratégias de marcação seletiva de proteínas de membrana

Alterações na membrana do eritrócito induzidas pelo parasito, como a exposição de proteínas parasitárias ou modificações conformacionais do hospedeiro, ocorrem em baixa abundância, possivelmente como estratégia de evasão imunológica (Chan et al., 2014; Florens et al., 2004). Nesse contexto, a utilização de métodos altamente sensíveis torna-se fundamental para a detecção de tais eventos moleculares (Elia, 2008).

A biotilação é amplamente utilizada na investigação proteica por permitir a marcação de alvos sem comprometer sua função biológica, além de viabilizar a purificação eficiente por afinidade com avidina ou estreptavidina, uma variante bacteriana cuja afinidade pela biotina representa uma das interações não covalentes mais fortes conhecidas entre proteína e ligante ($K_d \sim 10^{-14}$ M) (N. M. Green, 1975; Renuse et al., 2020; Wilchek & Bayer, 1988).

Essa estratégia tem sido empregada na caracterização de proteínas associadas à parede celular em uma variedade de organismos, incluindo *Borrelia burgdorferi* (Luft et al., 1989), *Saccharomyces cerevisiae* (Cappellaro et al., 1998), *Candida albicans* (Casanova et al., 1992), *Helicobacter pylori* (Sabarth et al., 2002), *Schistosoma mansoni* (Braschi & Wilson, 2006) e *Cryptococcus neoformans* (Foster et al., 2007).

No contexto da malária, diferentes derivados de biotina têm sido empregados para rotular proteínas na superfície de eritrócitos infectados por *P. falciparum* (Azim-Zadeh et al., 2007; Baumeister et al., 2003; Florens et al., 2004; Sharling et al., 2007; Winter et al., 2003, 2005). Esses estudos evidenciam a eficácia da biotilação seletiva como ferramenta para a caracterização da composição proteica da superfície celular, possibilitando a identificação de antígenos do parasito, bem como de proteínas do hospedeiro redistribuídas ou modificadas ao longo da infecção.

Embora modificações químicas específicas de resíduos de aminoácidos, aliadas à espectrometria de massas, sejam amplamente utilizadas para o estudo da estrutura terciária de proteínas (Bennett et al., 2000; Rudashevskaya et al., 2013; Zhang et al., 2009), os derivados de biotina oferecem vantagens adicionais. Dentre elas, destacam-se a visualização prévia das proteínas rotuladas, o enriquecimento seletivo de peptídeos marcados por afinidade e a disponibilidade de variantes

impermeáveis à membrana, permitindo a marcação específica de proteínas localizadas na superfície celular, reduzindo significativamente a contaminação por proteínas intracelulares (Elia, 2008).

Importante destacar que os dados obtidos a partir dessa abordagem não se restringem à simples identificação proteica, mas também oferecem informações estruturais e topológicas cruciais (Hung et al., 2016; Rhee et al., 2013). Esses dados são particularmente valiosos para a predição e refinamento de estruturas de proteínas transmembrana.

1.7.1.1. Abordagens baseadas em aminas e sulfidrilas (método químico)

Para a identificação das proteínas de superfície da membrana plasmática, uma das estratégias que pode ser utilizada é a biotinylação química direcionada a grupos amina livres, dispensando a necessidade de catálise enzimática. Nesta abordagem, utilizam-se derivados de biotina contendo um grupo N-hidroxissuccinimida (NHS), que reagem de forma covalente com os resíduos de lisina expostos na superfície das proteínas (**Figura 7**). Modificações como a adição de grupos sulfato, de carga negativa, aumentam a solubilidade do reagente em meio aquoso e impedem sua difusão passiva através da membrana, o que reforça a seletividade da marcação para proteínas de superfície (Schiapparelli et al., 2014).

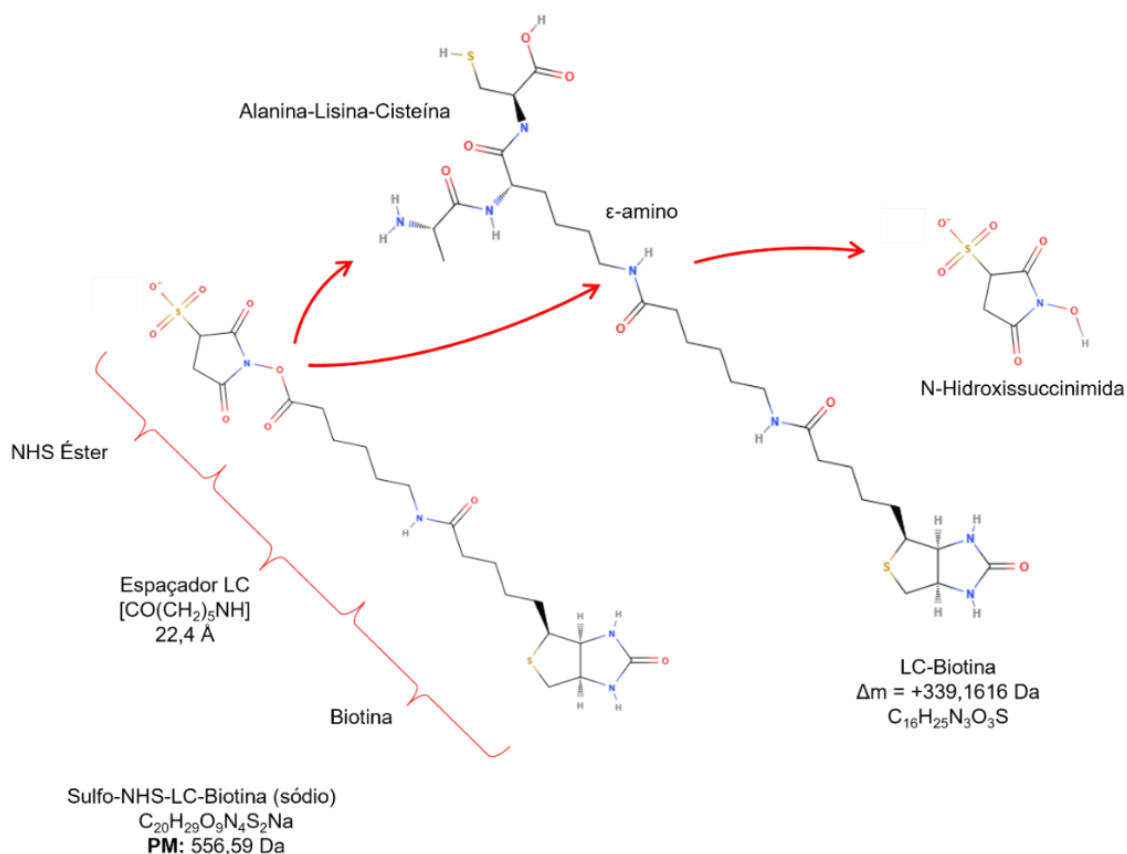


Figura 7. Mecanismo de acoplamento de ésteres de N-hidroxissuccinimida (NHS). O processo ocorre por ataque nucleofílico de aminas primárias, como as do resíduo de lisina, ao grupo NHS, resultando na biotinação covalente da proteína. Essa reação é espontânea e não requer catálise enzimática.

Por outro lado, métodos alternativos visam a marcação seletiva de grupos sulfidríla, tipicamente presentes em resíduos de cisteína reduzidos. Nessa estratégia, utilizam-se reagentes alquilantes como a maleimida biotinilada (**Figura 8**), que forma ligações covalentes estáveis com tais grupos funcionais. Essa abordagem permite a biotinação direcionada de proteínas contendo cisteínas acessíveis, ampliando as possibilidades de rotulagem seletiva de componentes de superfície. (Barua et al., 2020; Elia, 2008).

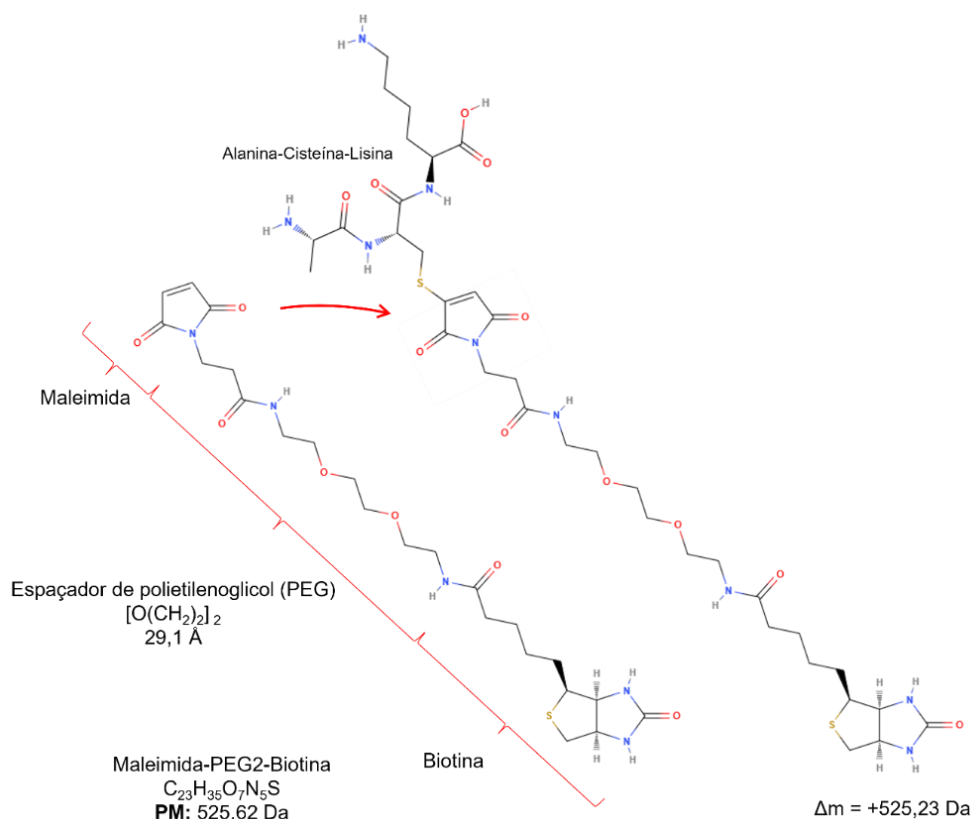


Figura 8. Mecanismo de acoplamento de Maleimide-PEG2-Biotin. A reação ocorre por adição de grupos sulfidríla, como os presentes na cisteína, ao anel maleimida, formando uma ligação tioéter estável. Esse acoplamento é altamente específico e ocorre de forma covalente, permitindo a biotinição direcionada de proteínas contendo resíduos de cisteína acessíveis.

1.7.1.2. Método dependente de proximidade

Os métodos utilizando ascorbato peroxidase modificada (APEX) estão sendo usados predominantemente para mapear a constituição proteica de distintos compartimentos subcelulares, que não podem ser purificados para análise convencional. A ascorbato peroxidase modificada, se baseia em mutações de uma peroxidase de planta (*Glycine max*), e inicialmente aplicado a estudos de microscopia eletrônica, depois foi desenvolvido para biotinição de proteínas dependente de proximidade. A APEX monomérica com atividade catalítica aumentada, oxida biotina tiramida na presença de peróxido de hidrogênio, gerando radicais de vida curta que reagem covalentemente com tirosina (Y) e potencialmente em menor proporção outros aminoácidos ricos em elétrons, triptofano e cisteína (**Figura 9**) (S. Han et al., 2017; Y. Han et al., 2019; Hung et al., 2016; Quintero-Ferrer et al., 2025).

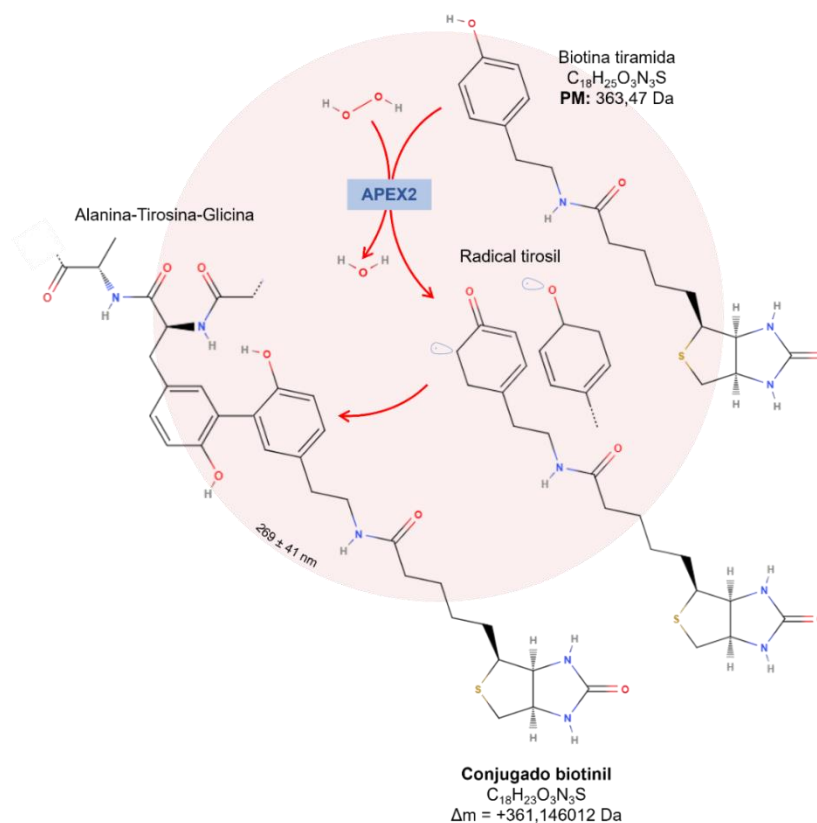


Figura 9. Mecanismo de geração e acoplamento do radical tirosil nas tirosinas por APEX2. A APEX2, na presença de peróxido de hidrogênio, catalisa a oxidação de fenóis biotinizados, gerando radicais fenóxil altamente reativos. Esses radicais reagem covalentemente com grupos fenol presentes nos resíduos de tirosina de proteínas próximas, promovendo a biotinilação dependente de proximidade com alta resolução espacial. Modificado da fonte: (Quintero-Ferrer et al., 2025)

1.7.2. Lise e centrifugação diferencial

A bicamada lipídica, que delimita a célula e suas organelas subcelulares, apresenta características peculiares que podem ser exploradas para enriquecer frações contendo membranas, viabilizando a distinção entre proteínas citosólicas e membranares. No contexto específico do *P. falciparum*, a separação da membrana dos eritrócitos dos demais elementos estruturais é de vital importância. Yadavalli e colaboradores ressaltam a eficácia da estreptolisina O (SLO), saponina, digitonina e Triton X-100, permitindo uma permeabilização progressiva das diversas membranas e facilitando a localização da proteína MC-2TM nos compartimentos celulares (**Figura 10**) (Yadavalli et al., 2021). Seguindo essa abordagem, a utilização da SLO possibilita a separação da membrana eritrocítica das demais estruturas e compartimentos, e com subsequente centrifugação, permite o enriquecimento das proteínas da membrana.

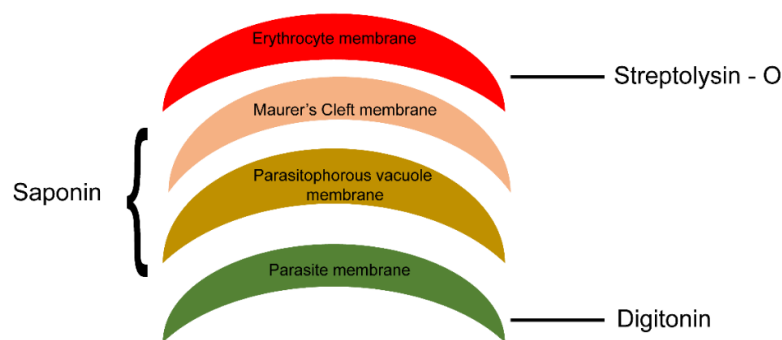


Figura 10. Representação esquemática das membranas de diferentes compartimentos de eritrócitos infectados, permeabilizados utilizando estreptolisina O e detergentes. SLO permeabiliza a membrana do eritrócito, a saponina em combinação com SLO permeabiliza a membrana do vacúolo parasitóforo e da membrana das fendas de Maurer, e a digitonina em combinação com SLO permeabiliza a membrana do parasito, mantendo intactas as organelas do parasito. Fonte: (Yadavalli et al., 2021)

1.8. Espectrometria de massas e biologia estrutural

A proteômica e a biologia estrutural, embora tenham se desenvolvido de forma relativamente independente, apresentam um elevado potencial de integração. A proteômica possibilita a identificação, em larga escala, de proteínas, isoformas, interações e modificações pós-traducionais, mas frequentemente requer a desnaturação das amostras, o que impede a preservação do contexto estrutural dessas modificações. Em contraste, a biologia estrutural, por meio de técnicas como cristalografia associada à difração de raios X e microscopia eletrônica, fornece modelos tridimensionais detalhados de complexos proteicos, embora se baseie, em muitos casos, no uso de proteínas recombinantes sem modificações fisiológicas e desprovidas de regiões dinamicamente relevantes.

A espectrometria de massas estabelece um ponto de convergência entre essas abordagens, ao permitir a análise de complexos proteicos intactos em condições nativas, integrando dados de estequiometria, topologia e dinâmica com informações proteômicas sobre modificações específicas. Assim, essa combinação metodológica amplia a compreensão funcional e estrutural de complexos macromoleculares e revela o impacto regulatório das modificações pós-traducionais no ambiente celular (Zhou & Robinson, 2010).

Um exemplo marcante é a modificação estrutural da proteína Band 3 (AE1) em eritrócitos infectados por *P. falciparum*. Band 3, principal trocador aniônico da membrana eritrocitária, é o transportador de ânions mais abundante nos eritrócitos

humanos (Ansorge et al., 1996). Comparações entre células infectadas e não infectadas demonstraram que, nos eritrócitos saudáveis, o resíduo Lys826 situado em um laço extracelular flexível é biotinizado (Sulfo-NHS-LC-Biotin). Em eritrócitos infectados, porém, Lys826 torna-se inacessível, indicando um rearranjo conformacional induzido pelo parasito, consistente com resultados prévios baseados em anticorpos monoclonais (Azim-Zadeh et al., 2007). A alteração no padrão de reconhecimento de epítomos reforça essa evidência estrutural (Winograd & Sherman, 2004), e tal rearranjo possivelmente contribui para a adaptação e persistência do parasito no interior do eritrócito (Baumeister et al., 2006).

Evidências adicionais, apoiadas em marcações sequenciais com ésteres de diferentes comprimentos de cadeia, indicam que o canal aniônico de superfície do parasito possui múltiplos resíduos de lisina próximos ao poro extracelular. A inibição observada resulta de impedimento estérico da cadeia lateral amida-ligada, e, em conjunto com o efeito do pH sobre a permeação, os dados sugerem que a ampla seletividade do canal decorre da interação entre repulsão eletrostática de cátions e um sítio de ligação fraco para solutos, explicando a eficiente exclusão de íons sódio (Cohn et al., 2003).

Esses resultados demonstram como a integração entre abordagens proteômicas, estruturais e biofísicas permite não apenas mapear alterações conformacionais em proteínas de membrana, mas também compreender seus efeitos funcionais em nível celular, reforçando o valor de metodologias híbridas na investigação de processos infecciosos e regulatórios.

1.9. Plataformas de dados para o estudo de proteínas de membrana

Independentemente da abordagem escolhida para o enriquecimento de proteínas de superfície e da subsequente análise por espectrometria de massas, as proteínas transmembranares em geral permanecem insuficientemente caracterizadas. Ferramentas bioinformáticas de previsão de alta eficácia surgem como aliadas capazes de contribuir de forma complementar aos dados experimentais.

As banco de dados estruturais desempenham um papel essencial ao fornecerem um vasto conjunto de informações que possibilitam a modelagem e predição detalhada da estrutura tridimensional das proteínas presentes na membrana. Bancos de dados, tais como *Data Bank of Transmembrane Proteins* (PDBTM) (Kozma et al., 2013; Tusnády et al., 2005), *The Orientations of Proteins in Membranes*

database (OPM) (Lomize et al., 2012) e *Membrane Proteins of Known 3D Structure* (mpstruc) (Bittrich et al., 2022), são dotadas de uma gama de algoritmos sofisticados. Estes algoritmos são especializados em extrair e refinar, de maneira automatizada e exclusiva, as estruturas das proteínas de membrana a partir do *Protein Data Bank* (PDB). Este refinamento pode incluir a determinação da orientação dos planos de membrana ou o preenchimento de átomos faltantes nas estruturas.

Especificamente, a PDBTM é uma base de dados dedicada às estruturas de proteínas transmembranares α -helicoidais e β -barril. Ela utiliza o algoritmo TMDet para localizar geometricamente os planos de membrana, por outro lado, o banco de dados OPM desenvolveu o algoritmo PPM 3.0 para a coleta tanto de proteínas integrais quanto periféricas de membrana, utilizando a orientação dos planos de membrana como critério. Durante esse procedimento, todos os aminoácidos das proteínas transmembranares são minuciosamente anotados e determinados por meio da minimização de uma função de energia de transferência. Ao contrário desses dois bancos de dados, a mpstruc armazena semanalmente estruturas de proteínas de membrana atualizadas manualmente a partir do PDB, sem a orientação de membrana calculada, mas com informações funcionais e taxonômicas.

Além das banco de dados previamente mencionadas, surgiram outros bancos de dados, *Database of Membrane Proteins Embedded in Lipid Bilayers* (MemProtMD) (Newport et al., 2019; Stansfeld et al., 2015), *Database for Eukaryotic Peripheral Membrane Proteins* (PerMemDB) (Nastou et al., 2020) e *Encyclopedia of Membrane Proteins Analyzed by Structure and Symmetry* (EncoMPASS) (Sarti et al., 2019), MemProtMD representa um compêndio de proteínas integradas à membrana, ao passo que o PerMemDB se configura como um repositório dedicado a proteínas periféricas de membrana. O EncoMPASS destaca-se por sua ênfase nas simetrias e similaridades homólogas de estruturas de proteínas de membrana baseadas em cadeias únicas, coletadas a partir do OPM.

Recentemente, foi estabelecido o banco de dados *TmAlphaFold database* (Dijkman et al., 2021), baseado na tecnologia de aprendizado de máquina AlphaFold2 (Yang et al., 2023), este banco de dados tem por objetivo disponibilizar previsões estruturais de proteínas com elevada precisão, destacando-se particularmente no contexto das proteínas transmembrana.

No âmbito do *Plasmodium*, o banco de dados PlasmoDB disponibiliza ferramentas que permitem a geração de informações, a partir de dados genômicos,

sobre a direcionamento e localização de proteínas, tanto com domínio transmembrana, como o motivo HT (Hiller et al., 2004) e o PEXEL (Marti et al., 2004) identificados por diferentes algoritmos e apresentam especificidades ligeiramente distintas, mas reconhecem a mesma sequência central (RxLxE/Q/D).

A **Tabela 1** apresenta os bancos de dados, juntamente com o número total de proteínas de membrana identificadas em cada uma delas e a **Figura 11** ilustra a interseção entre esses conjuntos, evidenciando as sobreposições e exclusividades das proteínas entre as diferentes bases especializadas.

Tabela 1. Banco de dados com o número de proteínas membranares de *Plasmodium* spp.

Nome	Fonte	Número de estruturas
PlasmoDB	https://plasmodb.org/plasmo/app/	1629
	Membrana de eritrócito (motivo PEXEL)	317
	Membrana de eritrócito (motivo HT)	222
TmAlphaFold	https://tmalphafold.ttk.hu/	1831
PDBTM	http://pdbtm.enzim.hu	6
OPM	https://opm.phar.umich.edu	14
RCSB PDB	https://www.rcsb.org/	7
mpstruc	https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc	9
MemProtMD	http://memprotmd.bioch.ox.ac.uk	6
PerMemDB	http://83.212.109.111:8088/permembdb	24
Número de entradas únicas		2074

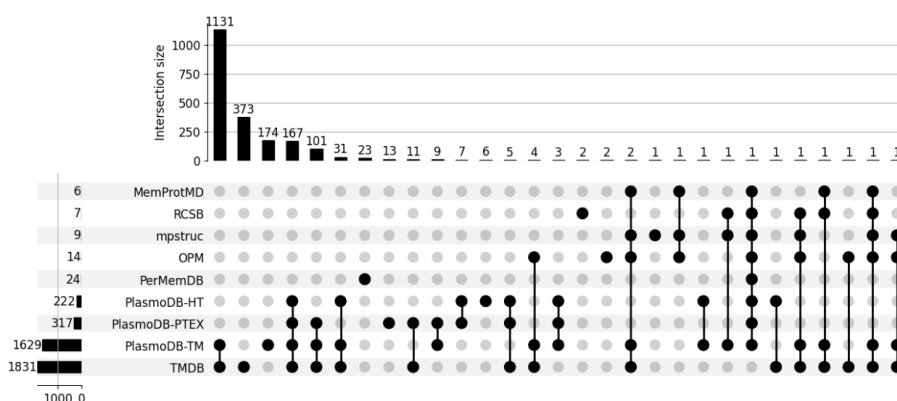


Figura 11. Interseção de proteínas de membrana identificadas em diferentes bancos de dados. Sobreposições e exclusividades entre conjuntos proteômicos de membrana de *Plasmodium* derivados de distintos bancos de dados especializadas em proteínas de membrana.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Enriquecer e identificar proteínas exportadas até a superfície da membrana de eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*, candidatas a novas estratégias terapêuticas.

2.2. Objetivos específicos

Estudar proteínas de *Plasmodium falciparum* encontradas na superfície de eritrócitos utilizando técnicas de biotinylação e enriquecimento dos peptídeos biotinilados:

- a. Identificar o repertório de proteínas de membrana associadas a eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* mediante isolamento por centrifugação diferencial e análise proteômica por espectrometria de massas.
- b. Biotinilar seletivamente proteínas de membrana expostas em eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* utilizando EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin e EZ-Link™ Maleimide-PEG2-Biotin e proceder à sua identificação por espectrometria de massas.
- c. Implementar um sistema de biotinylação mediada por APEX2 recombinante ativa, produzida em *Escherichia coli*, para marcação e identificação de proteínas de membrana de eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*.

III. JUSTIFICATIVA

A malária continua sendo uma das doenças infecciosas mais devastadoras do mundo, com *Plasmodium falciparum* destacando-se como o principal responsável pelas formas mais graves e fatais (WHO, 2024). A fase eritrocitária do ciclo do parasito constitui o ponto crítico da infecção, pois nela se desenrolam processos celulares complexos que asseguram sua sobrevivência, multiplicação e transmissão. Durante essa etapa, o parasito promove profunda remodelação da célula hospedeira, alterando a permeabilidade da membrana eritrocitária para favorecer a captação de nutrientes essenciais e a excreção de subprodutos metabólicos (Garten et al., 2018; Jackson et al., 2007). Tais modificações são mediadas por proteínas exportadas que participam da formação de canais iônicos e transportadores especializados, determinantes para o crescimento e a replicação intracelular (Bakar et al., 2010; Bergman et al., 2003).

O sistema de exportação de proteínas parasitárias para o citoplasma e a membrana do eritrócito representa um dos mecanismos mais sofisticados de adaptação evolutiva dos *Plasmodium*. Esse processo envolve a ação coordenada de complexos moleculares, como o PTEX, responsáveis pela translocação de centenas de proteínas efetoras que remodelam o citoesqueleto e a superfície eritrocitária, conferindo novas propriedades adesivas e antigênicas (Elsworth et al., 2014; Florens et al., 2004; Jonsdottir, Counihan, et al., 2021). A exposição dessas proteínas na membrana é essencial para a interação com o endotélio vascular, promovendo o fenômeno de citoaderência, evento central na patogênese da malária grave (Flick & Chen, 2004; Watermeyer et al., 2016).

A citoaderência, mediada principalmente pela PfEMP1 e outras proteínas de superfície, é crucial para o sequestro de eritrócitos infectados na microvasculatura, o que impede sua depuração esplênica, mas simultaneamente desencadeia inflamação local, hipóxia e dano tecidual (Carvalho et al., 2013; Wahlgren et al., 2017; K. L. Waller et al., 1999). Essa estratégia de evasão imune, associada à alta variabilidade antigênica das proteínas exportadas, contribui para a persistência da infecção e a recorrência clínica (van Ooij et al., 2008; Warncke et al., 2016).

Outros eventos determinantes no ciclo intraeritrocitário são a invasão e o egresso dos merozoítos, que marcam o início e o término de uma rodada replicativa, bem como o começo de novas infecções celulares. No caso do egresso, esse

processo, altamente regulado, depende de eventos proteolíticos e da ruptura coordenada de múltiplas membranas, constituindo uma etapa crítica para a disseminação do parasito (Absalon et al., 2018; Nofal et al., 2021). Compreender seus mecanismos moleculares é fundamental para identificar pontos vulneráveis passíveis de exploração terapêutica (Farrell et al., 2024; Tolia et al., 2005).

Diante desse contexto, o estudo proteômico das proteínas de *P. falciparum* exportadas até a membrana plasmática dos eritrócitos infectados assume relevância científica e biomédica singular. Essas proteínas participam ativamente da modificação da permeabilidade celular, da adesão endotelial e da evasão imunológica, além de representarem alvos acessíveis à resposta imune do hospedeiro (Crompton et al., 2010; Florens et al., 2004; Külzer et al., 2015). A caracterização detalhada dessas moléculas fornece conhecimentos fundamentais para o eventual desenvolvimento de estratégias vacinais e terapêuticas inovadoras, capazes de interferir nos mecanismos de virulência e transmissão do parasito (Kaslow & Biernaux, 2015; Torres et al., 2022).

IV. METODOLOGIA

Inicialmente, foi realizado o cultivo *in vitro* sincronizado de *P. falciparum* linhagem 3D7, com o objetivo de obter populações homogêneas em estágios específicos do ciclo intraeritrocitário. Em seguida, as hemácias infectadas por trofozoítos tardios e esquizontes, foram enriquecidas por meio de separação em gradientes de densidade de Percoll[®], o que possibilitou o isolamento seletivo das células parasitadas por essas formas diferenciadas (Brown et al., 2020; Miao & Cui, 2011).

Para acessar seletivamente as proteínas plasmáticas da membrana do eritrócito, foi empregada lise controlada com SLO, uma toxina que lisa a membrana plasmática da célula hospedeira sem comprometer o vacúolo parasitóforo (Külzer et al., 2015; Siau et al., 2023). A partir desse procedimento, foram obtidas três frações experimentais: a fração membranar, que contém a membrana plasmática do eritrócito e estruturas exportadas pelo parasito; a fração citosólica, composta pelo conteúdo citoplasmático da célula hospedeira; e a fração parasitária, que contém os parasitos intactos localizados no vacúolo parasitóforo (**Figura 12**).

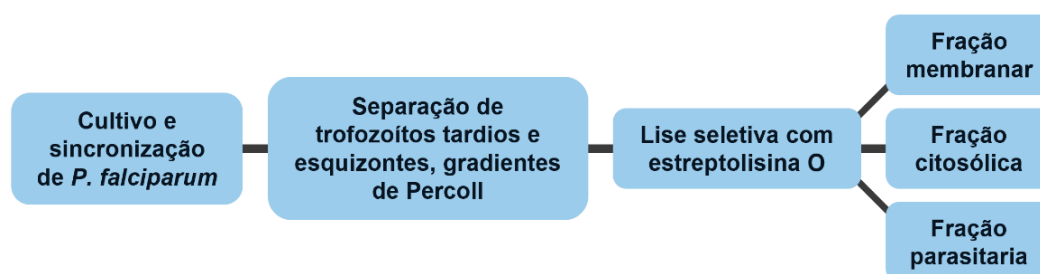


Figura 12. Estratégia experimental geral para a obtenção de frações subcelulares do eritrócito infectado por *P. falciparum*. (1) cultivo e sincronização de *P. falciparum*; (2) enriquecimento de trofozoítos tardios e esquizontes por gradientes de Percoll; (3) lise seletiva da membrana do eritrócito com estreptolisina O; e (4) separação das frações membranar, citosólica e parasitária para posterior análise proteômica.

Essas frações foram submetidas à análise proteômica por espectrometria de massas, com o intuito de gerar um panorama abrangente das proteínas presentes em cada compartimento. O âmbito era de fornecer uma base comparativa robusta para compreender a distribuição proteica e identificar, de forma preliminar, candidatos potenciais à localização na membrana do parasito exportadas até o eritrócito. As

proteínas identificadas foram comparadas com uma base de dados composta por proteínas de membrana previamente caracterizadas por abordagens *in silico* e experimentais coletados na literatura, permitindo a priorização de alvos com maior potencial de localização na superfície. Além disso, foi aplicada a análise funcional por enriquecimento de ontologia gênica, com o objetivo de inferir os processos biológicos, funções moleculares e localizações celulares associadas às proteínas identificadas. Com base nesses resultados integrados, foi então aplicada uma estratégia complementar de marcação seletiva por biotilação, direcionada especificamente às proteínas de superfície, visando aumentar a especificidade da identificação, validar achados prévios e detectar proteínas de baixa abundância que poderiam não ser reveladas na análise proteômica global (**Figura 13**).

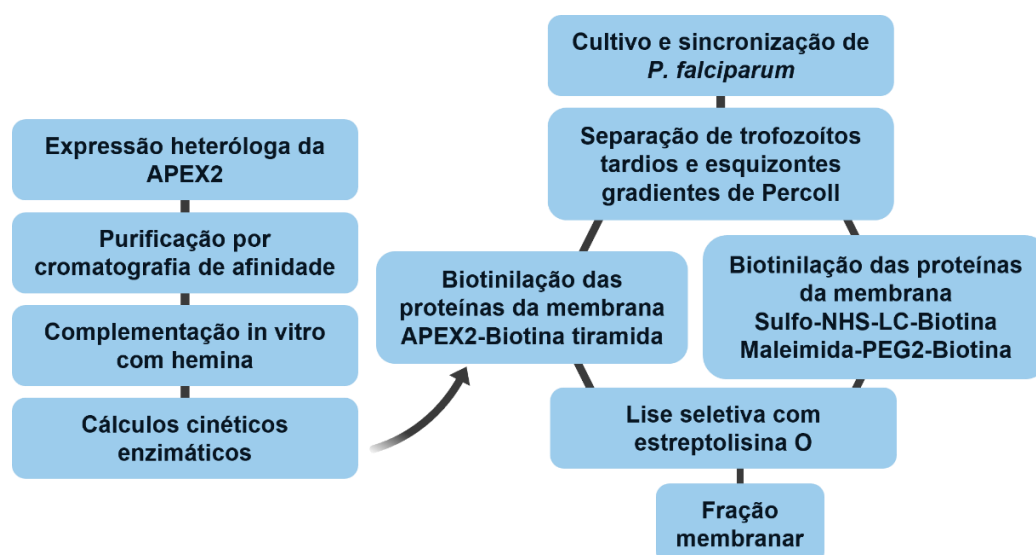


Figura 13. Estratégia experimental geral para a obtenção e caracterização das frações subcelulares do eritrócito infectado por *P. falciparum* após biotilação da membrana. Inicialmente, foi realizada a biotilação seletiva das proteínas de superfície dos eritrócitos infectados, utilizando reagentes específicos para aminas (Sulfo-NHS-LC-Biotina), sulfidrilas (Maleimida-PEG2-Biotina) ou métodos baseados em proximidade (APEX2). Em seguida, os eritrócitos foram submetidos à lise controlada com estreptolisina O, permitindo a separação da fração membranas, contendo proteínas da membrana plasmática marcadas com biotina.

4.1. Cultivo e sincronização de *P. falciparum* e obtenção das formas parasitárias maduras e lise seletiva

4.1.1. Cultivo sincronizado de *P. falciparum*

A linhagem 3D7 de *P. falciparum* foi cultivada *in vitro* em eritrócitos humanos, utilizando meio RPMI 1640 completo, contendo RPMI 1640 com L-glutamina (Gibco,

Thermo Fisher Scientific), suplementado com 10% de soro humano inativado, 25 mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 22 mM de glicose (Sigma-Aldrich), 24 mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 0,368 mM de hipoxantina (Sigma-Aldrich) e 25 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich, G1397), ajustando o pH a 7,4. O hematócrito foi mantido entre 0,8–1,5%, e os níveis de parasitemia foram meticulosamente controlados dentro da faixa de 2–5%. A cultura foi mantida em frascos de cultura de tecidos de 75 ou 150 cm² com tampa ventilada a 37 °C em um ambiente microaerofílico de 5% de CO₂ (William Trager & Jensen, 1976). A cultura foi manipulada em uma cabine de fluxo laminar seguindo técnicas assépticas padrão, com uso contínuo de luvas. Todos os materiais foram esterilizados, e o meio de cultura foi filtrado por um sistema de pressão positiva usando filtro de 0,22 µm antes do uso.

É relevante observar que a utilização de eritrócitos e plasma de doadores humanos para a cultura parasitária foi devidamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP/UnB).

Com o propósito de alcançar a sincronização da cultura, as células osmoticamente intolerantes, contendo trofozoítos e esquizontes, foram submetidas à lise utilizando sorbitol (Lambros & Vanderberg, 1979) (Sigma-Aldrich), possibilitando a obtenção de parasitos em uma fase única de desenvolvimento, mais especificamente, na forma de anéis. Para alcançar esse propósito, a cultura com alta parasitemia de anéis foi verificada mediante microscopia ótica de esfregaços corados com panótico rápido (InstProv, New Prov, Brasil), em seguida foi centrifugada a 600 g por 5 min a 25 °C, removendo-se o sobrenadante. Posteriormente, foi adicionado 10–15 vezes o volume do pellet de uma solução estéril de sorbitol a 5% (p/v), previamente aquecida a 37 °C, o pellet foi ressuspendido gentilmente e incubado 10 min a 37 °C em banho-maria. Após o período de incubação, procedeu-se à centrifugação nas mesmas condições anteriores e à lavagem três vezes com PBS 1X (pH 7,2) estéril ou RPMI sem soro, sempre realizando centrifugação e remoção do sobrenadante. Finalmente, a cultura foi retomada com 2% de hematócrito (Radfar et al., 2009).

4.1.2. Separação de formas parasitárias de *P. falciparum* por meio de gradientes de Percoll®

Buscando adquirir as formas maduras do ciclo eritrocitário de *P. falciparum* especificamente os trofozoítos tardios (30–36 horas pós-invasão) e esquizontes (36–

42 horas pós-invasão), caracterizados por modificações extensivas na superfície celular, formação das fendas de Maurer ancoradas ao citoesqueleto e a rede túbulo-vesicular, fundamentais para o transporte de proteínas do parasito, foi então aproveitada a variação de densidade dos eritrócitos nos distintos estágios em relação à solução de Percoll® (Percoll™ PLUS; GE Healthcare) na concentração de 65% (v/v) (Miao & Cui, 2011).

A partir de uma cultura contendo uma parasitemia de 10% de formas majoritariamente de trofozoítos e esquizontes, procedeu-se à centrifugação em tubos estéreis de 50 ml a 600 g por 5 min, à 25 °C, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e o pellet resultante foi ressuspensionado em meio RPMI completo, mantendo um hematócrito de 10–20%.

Em um tubo de 15 ml, foram adicionados 4 ml de Percoll® 65% (65% (v/v) Percoll™ PLUS, 7,2% (v/v) de PBS 10X estéril e 27,8% (v/v) de Meio RPMI sem soro) e cuidadosamente sem permitir a mistura 2 ml de Percoll® 35% (35% (v/v) Percoll™ PLUS, 3,9% (v/v) de PBS 10X estéril e 61,1% (v/v) de Meio RPMI sem soro). Finalmente, 4–5 ml dos eritrócitos ressuspensionados foram suavemente depositados, apoiando a ponta da pipeta contra a parede do tubo e atingindo a superfície do líquido lentamente. Em seguida e com cuidado, o tubo foi centrifugado a 1300 g por 11 min a 25 °C.

Com extrema atenção, procedeu-se à aspiração do meio RPMI e dos detritos, sendo a camada marrom correspondente aos eritrócitos contendo parasitos nas formas maduras cuidadosamente coletada e transferida para um tubo de 15 ml. Posteriormente, essa camada foi submetida a três lavagens com PBS 1X (pH 7,2), sempre centrifugando a 600 g por 5 min a 25 °C.

No caso da obtenção das frações não biotiniladas (**Figura 12**), uma vez lavadas, as células, majoritariamente compostas por trofozoítos tardios e esquizontes, foram diretamente submetidas ao tratamento com SLO (4.4). Por outro lado, no caso das frações subcelulares obtidas após a biotinilação da membrana plasmática eritrocitária (**Figura 13**), após a etapa de lavagem celular, realizou-se a biotinilação por três métodos diferentes e, conforme descrito na seção seguinte, procedeu-se à lise seletiva da membrana eritrocitária por SLO.

4.2. Obtenção eficiente da APEX2 recombinante

4.2.1. Expressão heteróloga da APEX2

O gene da proteína APEX2 foi sintetizado e clonado no vetor pET-100/D-TOPO (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen), que incorpora o gene da β -lactamase, conferindo resistência à ampicilina e permitindo a seleção de bactérias transformadas em meio contendo esse antibiótico. O gene da APEX2 foi desenhado com uma sequência codificante de uma cadeia de seis histidinas para facilitar a subsequente purificação (**Figura 14**) (Carneiro, 2019). A APEX2 recombinante apresenta peso molecular teórico de 33,53 kDa, incluindo os epítomos X-press Tag Peptide e FLAG[®] Epitope Tag, a cauda polihistidina. Com o grupo heme o peso molecular teórico aumenta para 34,15 kDa.

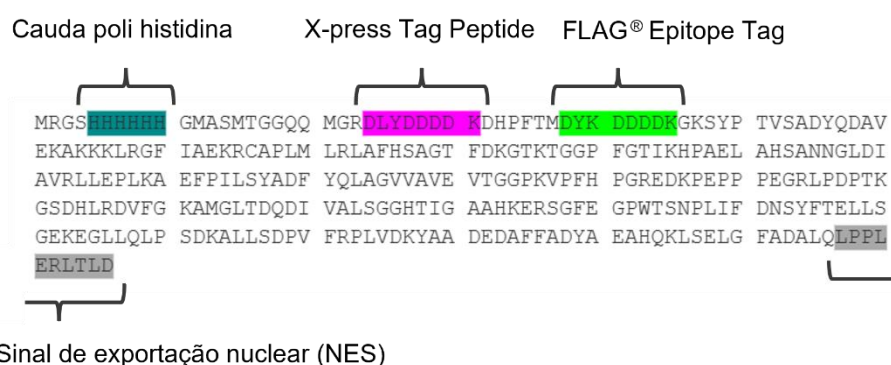


Figura 14. Sequência de APEX2 recombinante. A sequência da proteína recombinante APEX2 inclui uma cauda polihistidina para purificação, os epítomos X-press Tag Peptide e FLAG[®] Epitope Tag para detecção específica, e um sinal de exportação nuclear (NES) para o transporte da proteína do núcleo ao citoplasma.

Para a expressão, bactérias competentes *Escherichia coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) foram incubadas com 5 ng do plasmídeo em gelo por 30 min. Após esse período, foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 45 s, seguido por uma incubação em gelo por 30 min. A cultura resultante foi cultivada em 1–2 ml de meio *Super Optimal Broth* (SOB) a 37 °C por 1 h, sob agitação constante.

Em seguida, utilizando meio *Lysogeny Broth* (LB) ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina, 60 µl da cultura foram inoculados em placas e incubados por 16–18 h a 37 °C. Uma colônia isolada foi cultivada em um pré-inóculo de 10 ml de meio LB com 100 µg/ml de ampicilina a 37 °C, sob agitação constante de 200 rpm, por 18 h.

Posteriormente, 4 ml do pré-inóculo foram transferidos para 500 ml de meio LB, suplementado com ampicilina, e o inóculo foi cultivado a 37 °C, sob agitação constante de 200 rpm, até atingir uma densidade óptica (OD₆₀₀) entre 0,4–0,5.

A expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de 1 mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A cultura induzida foi mantida sob crescimento por 3 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm (Huang et al., 2019). Subsequentemente, a cultura foi centrifugada a 2000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e as bactérias sedimentadas foram lisadas utilizando o reagente BugBuster® Protein Extraction Reagent (Sigma-Aldrich, Novagen), seguindo as instruções do fabricante.

4.2.2. Purificação da APEX2 recombinante por cromatografia de afinidade

Após a validação da expressão da APEX2 nas frações solúveis, através da técnica de *Western blot* usando anticorpos anti-His, procedeu-se à purificação, fundamentada na afinidade da polihistidina por cátions metálicos bivalentes como o níquel. Para este propósito, utilizou-se uma resina HIS-Select® HF Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich).

Inicialmente, depositou-se 1 ml da resina na coluna de purificação. Em seguida, procedeu-se com a lavagem da resina utilizando 3–6 ml de água de elevada pureza ($\geq 18 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$ de resistividade a 25 °C), evitando que a resina secasse.

Posteriormente, adicionou-se 3 ml de tampão de equilíbrio/lavagem para assegurar o equilíbrio da resina, composto por Tris-HCl 50 mM, pH 8, cloreto de sódio 500 mM e imidazol 1 mM, adquirido da Sigma-Aldrich. A fração solúvel do extrato foi então passada lentamente a uma taxa de 600 µl/min, aproximadamente.

A resina foi lavada com 20 volumes de tampão de equilíbrio/lavagem 1 mM, totalizando cerca de 10 ml. Em seguida, para a eluição da enzima, empregou-se um tampão composto por Tris-HCl 50 mM (pH 8), cloreto de sódio 500 mM e imidazol em concentrações variáveis (5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100 mM). Foram coletados 15 ml da solução eluída, que foi posteriormente analisada por SDS-PAGE 12% e *Western blot*, visando confirmar a eluição e purificação da proteína.

Logo após, a APEX2 foi concentrada e o tampão trocado por PBS 1X (pH 7,0) usando filtro Amicon® Ultra-15 com membrana Ultracel–10K (Merck, Millipore), centrifugando a 3500 g por 20 min e dica com 500 µl de buffer. A proteína foi

congelada rapidamente em nitrogênio líquido e armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para armazenamento.

4.2.3. Complementação *in vitro* com hemina e medição da concentração da holoproteína

APEX2 precisa do grupo prostético ferro-protoporfirina IX (grupo heme) em seu sítio ativo, atuando como cofator na reação de redução-oxidação e uma histidina catalítica. Em determinadas situações, é necessário complementar a enzima com esse cofator para assegurar sua eficácia (Dalton et al., 1996).

Para esse fim, preparou-se uma solução de hemina (Sigma-Aldrich, 51280) a $100\text{ }\mu\text{M}$, diluída inicialmente em duas gotas de hidróxido de sódio 1 M. O volume foi ajustado com PBS 1X (pH 7,0), e o pH foi verificado. A solução foi então congelada rapidamente em nitrogênio líquido e armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. O estoque de hemina foi utilizado dentro de 1 hora após o descongelamento, não sendo recomendado o reuso, já que a exposição à luz e ao ar pode levar à degradação do composto, comprometendo sua eficácia (Y. Han et al., 2019).

Realizou-se o ajuste estequiométrico na proporção de 1:1,5 APEX2:Hemina (Huang et al., 2019), deixando incubando a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, com agitação suave por 15 min, seguida de centrifugação a 12000 g por 10 min, e o sobrenadante foi coletado como a holoenzima reconstituída.

Posteriormente, foi medida a Reinheitszahl (RZ), calculada como a razão de absorbância A_{403}/A_{275} , que avalia o conteúdo do grupo heme na peroxidase (apoproteína ou holoproteína) e a pureza da preparação. Peroxidases altamente purificadas geralmente apresentam um RZ em torno de três (Huang et al., 2019; Lavery et al., 2010).

4.2.4. Cálculos cinéticos enzimáticos

Para avaliar a atividade enzimática do APEX2, determinamos os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, empregando o guaiacol (Sigma-Aldrich) como substrato (Huang et al., 2019), e os resultados foram obtidos por meio do emprego do equipamento CLARIOstar® Plus, juntamente com o software MARS Data Analysis.

A avaliação da peroxidase APEX2 foi efetuada mediante a construção de uma curva padrão, a qual envolveu concentrações variadas de guaiacol, de 1 a 6 mM, com um intervalo de 1 mM. Adicionalmente, a azida de sódio (Sigma-Aldrich) a uma

concentração de 1 mM foi utilizada como controle negativo, ocasionando uma ligação irreversível ao cofator heme e, assim, inativando a enzima. O branco foi realizado empregando PBS 1X (pH 7,0).

O ensaio foi conduzido em microplacas do tipo Greiner Cellstar® 96 Well Plates Wells Flat Bottom, onde foram adicionados 100 µl de cada solução de guaiacol (Sigma-Aldrich) em PBS 1X (pH 7,0) nas concentrações previamente mencionadas. Simultaneamente, uma solução de 100 µl para cada poço contendo 40 nM de APEX2, complementada com hemina e 1 mM de peróxido de hidrogênio, em PBS 1X (pH 7,0), previamente incubada a 25 °C, 4 min. Após este intervalo, as soluções foram unidas por meio de injeção com uma taxa controlada de 300 µl/s pelo equipamento. Imediatamente após a união das soluções, foi registrado o aumento na absorbância a 470 nM, resultante da produção de tetraguaiacol (**Figura 15**). As leituras foram realizadas em intervalos de 10 s por 2 min, usando um coeficiente de extinção de 2,8 mM/cm.

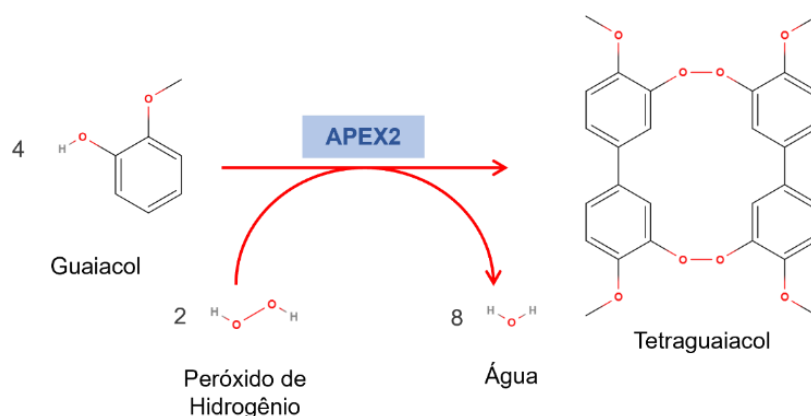


Figura 15. Oxidação do guaiacol para tetraguaiacol, reação catalisada pela peroxidase. Na presença de peróxido de hidrogênio, a peroxidase catalisa a oxidação do guaiacol, resultando na formação do tetraguaiacol, um produto de coloração marrom alaranjada, comumente utilizado como indicador da atividade enzimática.

4.2.5. Determinação da concentração ótima de biotina tiramida para a reação catalisada pela APEX2 recombinante

Para determinar a concentração ótima do substrato biotina tiramida a ser empregada na reação catalisada pela APEX2, foram testadas diferentes concentrações, variando entre 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM. As reações foram conduzidas utilizando 40 nM de APEX2 previamente complementada com hemina, na presença de 1 mM de peróxido de hidrogênio, e 1 mg/ml de BSA (bovine serum

albumin) em tampão PBS 1X (pH 7,0), durante 15 min de incubação controlada. Como controle negativo, foi empregada 1 mM de azida de sódio, utilizada como inibidor da reação enzimática (Azim-Zadeh et al., 2007). A eficiência da reação foi posteriormente avaliada por *Western blot*, utilizando streptavidina-HRP para a detecção da proteína BSA biotinilada.

4.3. Biotinilação das proteínas de membrana do eritrócito infectado com *P. falciparum*

4.3.1. Biotinilação das proteínas da membrana dos eritrócitos infectados com *P. falciparum*

Imediatamente depois de obter os trofozoítos e esquizontes com o protocolo de Percoll® a 65%, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X (pH 7,2) e centrifugadas a 600 g por 5 min a 25 °C e removendo o sobrenadante. Para os três ensaios de biotinilação foi usado cerca de 20 µl do concentrado celular contendo aproximadamente 2×10^8 hemácias e feito por triplicata.

4.3.1.1. Biotina fenol / Biotina tiramida

As células foram suspensas em 1 ml de PBS 1X (pH 7,2), e foram usados 2,5 µl de biotina tiramida (Adipogen, CDX-B0270) 200 mM em dimetil sulfóxido (DMSO) para atingir uma concentração final de 500 µM. A quantidade adequada de APEX2 (20 nM) (Lam et al., 2014) foi adicionada à mistura de reação, que foi então incubada por 30 min em um rotador a 37 °C. Após a incubação, foi adicionado 1 µl de peróxido de hidrogênio 1 M, para uma concentração final de 1 mM seguido de uma suave homogeneização e incubação precisa por 1 min. Posteriormente, 1 ml da solução *quencher* 2X (20 mM de azida de sódio, 20 mM de ascorbato de sódio e 10 mM de Trolox) (Sigma-Aldrich) foi adicionado, seguido por uma cuidadosa homogeneização. A centrifugação a 600 g por 4 min a 25 °C foi realizada, seguida pela remoção do sobrenadante. Finalmente, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X (pH 7,2) para eliminar o excesso de reagente de biotina e subprodutos.

4.3.1.2. Sulfo-NHS-LC-Biotina

As células foram ressuspensas em 500 µl de PBS (pH 8,0). Adicionou-se 1 µl da solução reagente de biotina EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher

Scientific) 1 M em DMSO, resultando em uma concentração final de 2 mM. A mistura foi incubada por 30 min a 25 °C, seguida de centrifugação e remoção do sobrenadante. As células foram lavadas três vezes com PBS 1X (pH 8,0) / glicina 100 mM e depois duas vezes com PBS 1X (pH 7,2), (Nilsson Bark et al., 2018).

4.3.1.3. Maleimida-PEG2-Biotina

As células foram suspensas em 1 ml de PBS 1X (pH 7,2) contendo DTT 2 mM, incubando por 30 min a 25 °C. Realizaram-se três lavagens com PBS 1X (pH 7,2) para remover o excesso de DTT, centrifugando a 500 g por 5 min a 25 °C e eliminando o sobrenadante. As células foram suspensas em 1 ml de PBS 1X (pH 7,2), seguido pela adição de 1 µl de EZ-Link™ Maleimide-PEG2-Biotin (Thermo Fisher Scientific) 20 mg/µl em DMSO, resultando uma concentração final de 0,2 mg/ml. A mistura de reação foi incubada por 30 min em rotação a 25 °C, seguida de centrifugação a 600 g por 5 min a 25 °C para remover o sobrenadante. Finalmente, as células foram submetidas a três lavagens com PBS 1X (pH 7,2) para eliminar o excesso de reagente de biotina e subprodutos (W. U. Chen et al., 2003).

4.4. Lise seletiva com estreptolisina O

Logo após a separação por gradientes de Percoll® e, quando realizada, a biotinição das proteínas de membrana, procedeu-se à lise das hemácias com estreptolisina O (SLO) para a extração seletiva das proteínas de membrana celular. O fracionamento tem por finalidade de reduzir significativamente a complexidade da amostra, aumentando assim a capacidade de detecção de proteínas de baixa abundância membranares das hemácias parasitadas.

Com o fim de preservar a integridade das proteínas, foram adicionados inibidores de protease cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, Roche), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, 8 µl (1600 U) de SLO (200 U/µl) foram acrescentados, seguidos por uma incubação de 4 min a 37 °C, e centrifugado a 400 g por 5 min a 4 °C, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo (S1a). O pellet resultante (P1) foi reservado no gelo. O S1a foi centrifugado a 1000 g por 5 min a 4 °C, recuperando o sobrenadante (S1b) e descartando o pellet (Jackson et al., 2007; Külzer et al., 2015).

Posteriormente, o S1b foi centrifugado a 20.000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo (S2), enquanto o

pellet (P2) foi reservado no gelo. Ambos os pellets, P1 e P2, foram lavados três e duas vezes, sendo o P1 centrifugado a 1000 g por 10 minutos a 4 °C, e o P2 centrifugado a 20.000 g por 15 minutos a 4 °C, utilizando PBS 1X. As diferentes frações foram congeladas a –80 °C (**Figura 16**).

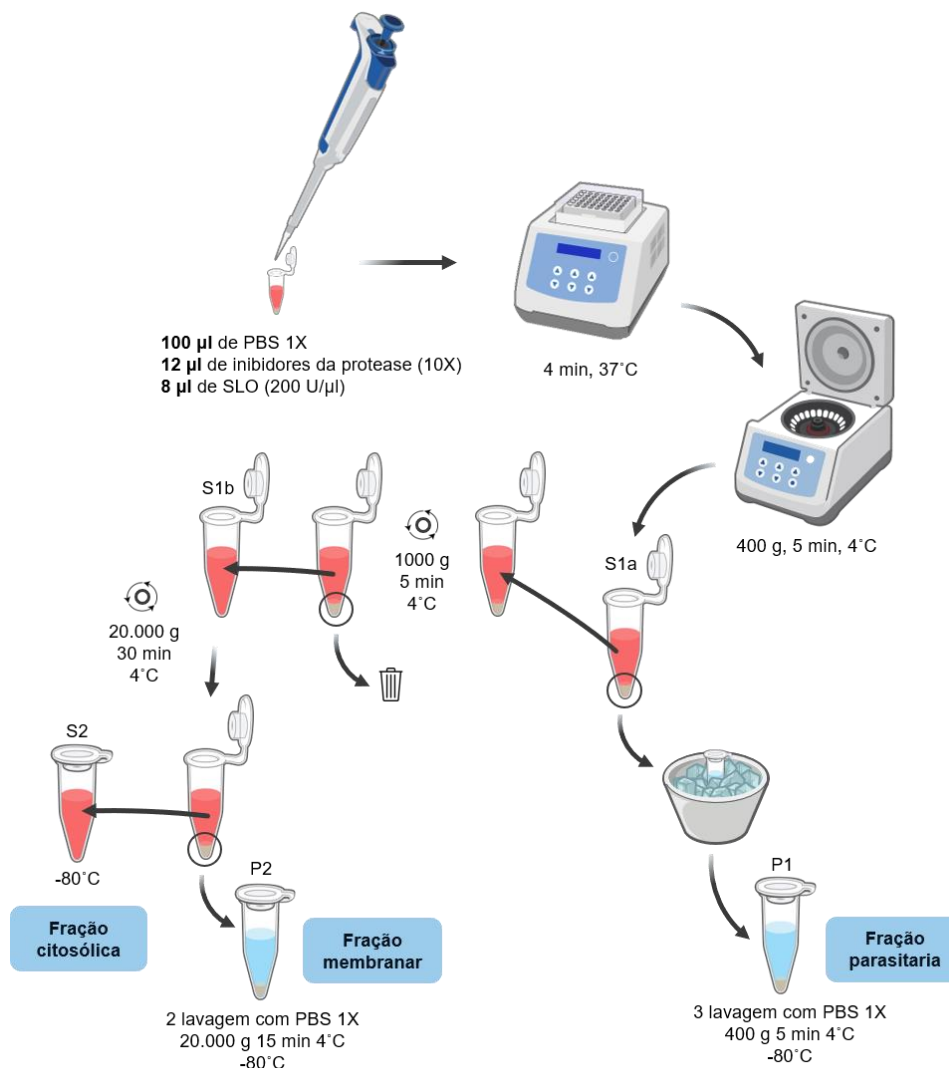


Figura 16. Fracionamento seletivo de eritrócitos utilizando estreptolisina O.

As hemácias foram lisadas com SLO para permitir a liberação seletiva do conteúdo citosólico, preservando os parasitos intactos. A centrifugação sequencial permitiu a separação das frações solúveis (S1a, S1b, S2) e dos pellets (P1 e P2), correspondentes, respectivamente, à fração parasitária e à fração membranária. As frações obtidas foram lavadas, processadas para SDS-PAGE, *Western blot* e armazenadas a –80 °C para análises posteriores.

4.5. Enriquecimento das proteínas biotinizadas com partículas magnéticas de estreptavidina

Para o preparo inicial das esferas magnéticas de estreptavidina, as partículas foram homogeneizadas antes do uso por inversão repetida, agitação suave em vórtex

ou por meio de uma plataforma rotativa. Em seguida, foram adicionados 30 a 40 μ l de esferas magnéticas (Streptavidin Magnetic Beads – Thermo Fisher Scientific, 88816) em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Os tubos foram posicionados em um suporte magnético (MagJET Separation Rack – Thermo Fisher Scientific, #MR02) por aproximadamente 1–2 min, permitindo a coleta das esferas na parede do tubo. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, evitando a secagem das esferas para prevenir agregação e perda de atividade de ligação (Karbanowicz et al., 2017).

Posteriormente, foi adicionada uma solução de 200 μ l de TBS (Tris base 248 mM (p/v), cloreto de sódio 1,37 M (p/v) e cloreto de potássio 27 mM (p/v), pH 7,4) contendo 0,1% de Tween-20 (pH 7,4) (Sigma-Aldrich). A mistura foi homogeneizada e as esferas novamente coletadas com auxílio do suporte magnético, descartando-se o sobrenadante. Esse procedimento garantirá a adequada pré-lavagem das partículas antes da etapa de captura das proteínas.

Para a ligação, foram combinados 30 μ l da amostra contendo proteínas de superfície biotinizadas, previamente diluídas em 300 μ l de PBS, com as esferas previamente lavadas. A mistura será incubada por 4 h a 4 °C em um rotador de tubos, sob agitação moderada. Ao final da incubação, as esferas foram recolhidas magneticamente e o sobrenadante será reservado para eventuais análises complementares.

Na etapa de lavagem, foram adicionados 400 μ l de TBS 0,1% Tween-20 (Sigma-Aldrich) ao tubo, seguido de leve homogeneização. As esferas foram coletadas novamente e o sobrenadante descartado. Esse passo será repetido duas vezes adicionais com 200 μ l da mesma solução tampão, assegurando a remoção de proteínas não ligadas.

Para a eluição das proteínas biotinizadas, foram adicionados 50 μ l do tampão de eluição contendo acetonitrila 80% (v/v), ácido trifluoroacético 0,2% (v/v) e ácido fórmico 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich) às esferas magnéticas, com três etapas sequenciais de incubação: duas a 90 °C por 3 min e uma à temperatura ambiente. Os sobrenadantes coletados ao final de cada incubação foram reunidos e conterão as proteínas eluídas. Para evitar a lixiviação da estreptavidina, o tempo total de exposição ao calor não excederá 10 min (Karbanowicz et al., 2017). As eluições obtidas foram concentradas em SpeedVac por aproximadamente 80 min.

4.6. Citolocalização das proteínas biotiniladas por ensaio de imunofluorescência

Para a preparação das amostras celulares, foram realizados esfregaços de hemácias infectadas previamente biotiniladas. Após a secagem, foram desenhados dois quadrados de aproximadamente 1,5 cm nas lâminas utilizando caneta de silicone, deixando-os secar por 10 min. A fixação das células será realizada com 100–200 µl de formaldeído a 4% (v/v) (Sigma-Aldrich) em PBS, com incubação por 15 min.

Será então realizada a permeabilização com 100–200 µl de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 0,1% (v/v) em PBS por 15 min, seguida de nova lavagem com PBS. Na etapa seguinte, será aplicado o bloqueio com 200 µl de leite desnatado a 5% (p/v) em PBS, com incubação por 1 h à temperatura ambiente.

A incubação com estreptavidina conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) foi conduzida em diluição 1:800, preparada em leite desnatado a 1% (p/v) em PBS, durante 30–60 min à temperatura ambiente, no escuro. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS para remoção do excesso de estreptavidina não ligada (Charneau et al., 2007).

Para a montagem das lâminas, será adicionada uma gota (3–5 µl) de ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen) sobre os poços com as amostras, no escuro. A lamínula será cuidadosamente posicionada sobre a amostra, permitindo a dispersão do reagente. O excesso será removido com auxílio de Kimwipes® (Sigma-Aldrich). As bordas da lamínula foram seladas com esmalte, ainda no escuro, e a preparação será deixada para cura por 1–2 h ou, preferencialmente, por 24 h à temperatura ambiente. Após esse período, as lâminas estarão prontas para análise por imunofluorescência.

4.7. Preparação de amostras para análise proteômica

4.7.1. Redução, alquilação e digestão das proteínas por tripsina

Para realizar a extração de proteínas, o tampão de lise foi adicionado à amostra (ureia 8 M, cloreto de sódio 75 mM, TEAB 50 mM e inibidor de protease) (Sigma-Aldrich), mantendo a temperatura a 4 °C. Na fase de redução e alquilação das cisteínas, o ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich) da solução estoque foi adicionado para atingir uma concentração final de 5 mM, incubando a 41 °C por 25 min, com precaução para evitar temperaturas superiores a 60 °C. Após o resfriamento da

solução, o iodoacetamida foi incorporada para alcançar uma concentração final de 14 mM, com incubação por 40 min em temperatura ambiente no escuro. O DTT foi novamente utilizado para atingir 5 mM e interromper o processo de alquilação (Suttapitugsakul et al., 2017).

No estágio de digestão com tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, V5111) a mistura foi diluída na razão 1:5 com bicarbonato de amônio 50 mM, e cloreto de cálcio foi adicionado para atingir uma concentração final de 1 mM. A tripsina foi então adicionada na proporção de 1:50 enzima:substrato/proteína, seguida de incubação a 37 °C por 18 h. A digestão foi interrompida por acidificação com ácido trifluoroacético (TFA) para uma concentração final de 0,5% (v/v), e a amostra foi dessalinizada (Promega, 1998).

4.7.2. Dessalinização de peptídeos por microcolunas de fase reversa

Os peptídeos foram dessalinizados utilizando microcolunas de fase reversa, construídas em ponteiras P-200 (Axygen) fabricadas a partir de discos de C18 Empore™ SPE (Empore) e uma mistura de OLIGO™ R3 Reversed e POROS™ 20 R2 Reversed (Thermo Fisher Scientific) na proporção de 70:30, respectivamente. A amostra, previamente liofilizada, foi ressuspensa em 50 µl de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich) a 0,1% (v/v), procedendo à acidificação até atingir a concentração final desejada, caso estivesse em suspensão (Rappsilber et al., 2007).

O condicionamento das microcolunas foi realizado com 150 µl de metanol (Sigma-Aldrich), seguido de centrifugação a 1000 g por 2 min, procedimento repetido. Após assegurar a completa eluição do metanol, 100 µl de uma solução composta por 100% de acetonitrila (ACN) (Sigma-Aldrich) e 0,1% (v/v) de TFA foram adicionados e centrifugados a 1000 g por 3 min, etapa repetida três vezes. Em seguida, procedeu-se à lavagem com 100 µl de TFA 0,1% (v/v), seguida de centrifugação a 1000 g por 3 min; procedimento repetido três vezes.

A amostra foi aplicada na coluna, seguido por centrifugação a 900 g por 4 min. Realizaram-se três lavagens com 200 µl de TFA 0,1% (v/v), seguidas de centrifugação.

A eluição dos peptídeos foi conduzida empregando 80 µl de ACN em concentrações progressivas de 20% (v/v), 50% (v/v) e 80% (v/v) em TFA 0,1% (v/v), utilizando centrifugações a 600 g por 3 min, com cada eluição sendo repetida duas

vezes. As frações eluídas, totalizando 720 µl, foram meticulosamente coletadas em tubo Eppendorf LoBind (Eppendorf SE).

Subsequentemente, os peptídeos foram quantificados, submetidos à liofilização por meio de um concentrador rotatório SpeedVac™ SC100 (Savant) e, posteriormente, ressuspensos em ácido fórmico a 0,1% (v/v) e armazenados a -20 °C até o dia das análises por espectrometria de massas.

4.7.3. Análise por espectrometria de massas

As amostras foram submetidas à análise por um sistema UltiMate™ 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific), acoplado a um espectrômetro de massas Q Exactive™ HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific). Todas as amostras (1 µg por corrida) foram inicialmente aplicadas a uma coluna de guarda de 2 cm, seguida pela fração em uma coluna PicoFrit™ Self-Pack de 25,5 cm (New Objective) empacotada com sílica de 1,9 micrômetros, ReproSil-684 Pur 120 Å C18-AQ (Dr. Maisch, Ammerbuch, Alemanha).

Cada amostra foi carregada em 0,1% (v/v) de ácido fórmico (FA) e 2% (v/v) de acetonitrila (ACN) na coluna de captura (100 µm de diâmetro interno) a 2 µl/min, enquanto a separação cromatográfica ocorreu na coluna analítica (75 µm de diâmetro interno) a 200 nl/min. A fase móvel A consistiu em 0,1% (v/v) de FA em água, enquanto a fase móvel B consistiu em 0,1% (v/v) de FA em ACN. Os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de 2% a 40% de eluente B ao longo de 32 min, seguido de um aumento para até 80% B em 4 minutos. A tensão da lente foi ajustada para 60 V.

O espectrômetro de massas foi configurado para aquisição DDA (data-dependent acquisition), o modo de varredura completa (full-scan) de MS foi adquirido com uma resolução de 60.000 (FWHM a m/z 200 e controle automático de ganho (AGC) ajustado para 3×10^6), com Max IT de 100 ms. Os 20 íons precursores mais abundantes (Top 20) de cada varredura (m/z 350–1.400) foram sequencialmente submetidos a fragmentação por dissociação por colisão de alta energia (higher collisional energy dissociation – HCD) com janela de isolamento de 2,0 m/z e energia de colisão normalizada de 35, excluindo íons 1+ e >6+ e aplicando exclusão dinâmica de 25 s. O limiar de intensidade (intensity threshold) para selecionar precursores foi definido em 1×10^3 counts. Os íons dos fragmentos resultantes (MS2) foram analisados com resolução de 15.000, usando um AGC ajustado para 1×10^5 e Max IT de 120 ms, no mesmo intervalo de m/z (350–1.400).

4.7.4. Análise de dados

4.7.4.1. Bioinformática

Os dados brutos foram visualizados utilizando o software Xcalibur v.4.2.47 (Thermo Scientific), enquanto os procedimentos de processamento foram executados por meio do software MetaMorpheus v1.1.5 (R. M. Miller et al., 2023; Solntsev et al., 2018).

Os espectros resultantes foram comparados com o banco de dados de proteínas da linhagem 3D7 de *Plasmodium falciparum* (UP000001450 [5.361 proteínas], 13-02-2024), disponível no UniProt (uniprot.org). Para *Homo sapiens*, foi utilizado o The Human Protein Atlas, 13-02-2024 (proteinatlas.org) na seção “The proteins actively secreted to human blood” [780 proteínas] para detectar possíveis interações entre proteínas no plasma sanguíneo e proteínas do parasito na membrana do eritrócito e as proteínas do eritrócito (“Erythroid cells”) [434 proteínas].

As buscas foram conduzidas com tolerância de massa para MS1 de 10 ppm e MS2 de 0,05 Da, permitindo até dois sítios de clivagem perdidos (até quatro no caso da lisina). Foram incluídas como modificações variáveis para todas as buscas a oxidação de metionina (+15,99 Da) e a acetilação da extremidade N-terminal (+42,01 Da). No caso das biotilações, as buscas foram feitas separadamente nos resíduos de tirosina (Y, +361,1460 Da), lisina (K, +339,1616 Da) e cisteína (C, +525,2257 Da). A carbamidometilação de cisteína (+57,02 Da) foi definida como modificação fixa (Charneau et al., 2024).

As identificações foram filtradas por $FDR \leq 1\%$ (false Discovery rate), considerando-se válidas apenas as proteínas que apresentassem pelo menos um peptídeo único e no mínimo dois peptídeos identificados por proteína.

4.8. Construção de uma base de dados de proteínas membranares do *Plasmodium* spp.

Com o objetivo específico de facilitar a comparação com os resultados obtidos através da espectrometria de massas, desenvolveu-se uma base de dados abrangente para as proteínas membranares do *Plasmodium* spp. Esta base reúne proteínas, que foram sistematicamente compiladas a partir de uma ampla gama de repositórios, conforme evidenciado na **Tabela 1**. Deu-se prioridade à inclusão de proteínas da cepa 3D7, sempre que estas estavam disponíveis, e efetuou-se a

remoção criteriosa de quaisquer entradas duplicadas por similaridade para garantir a precisão e a integridade dos dados coletados.

Para facilitar a análise, foram construídos três bancos de dados, organizados em categorias distintas: predições *in silico* (TMDB, MemProtMD, PerMemDB e PlasmoDB-TM), dados experimentais, de proteínas de membrana de estrutura conhecida (OPM, mpstruc e RCSB) e a base PlasmoDB HT-PTEX, que reúne proteínas com motivos de exportação. Para evitar redundâncias, as proteínas *in silico* que também estavam presentes nas bases experimentais foram excluídas.

4.9. Construção de redes de interação proteica

A análise das interações proteicas foi realizada utilizando a plataforma STRING v12.0, com o objetivo de explorar a organização funcional e estrutural das proteínas identificadas na base de dados de proteínas membranares e inferir potenciais complexos multiprotéicos. Foi gerada uma rede do tipo “full STRING network, physical subnetwork”, integrando todas as fontes ativas de evidência. Para a detecção de agrupamentos funcionais e predição de módulos de interação, foi aplicado o algoritmo de agrupamento baseado em algoritmo de Markov (Markov Cluster Algorithm – MCL), com “inflation parameter” de 4, “minimum required interaction” ajustado a 0,7. Essa abordagem foi empregada com a finalidade de priorizar alvos experimentais e gerar hipóteses sobre interações críticas que puderam ser validadas em análises subsequentes.

4.10. Análise funcional por enriquecimento de ontologia gênica (GO)

A análise de enriquecimento funcional foi conduzida por meio da ferramenta g:Profiler (Kolberg et al., 2023). Para evitar falsos enriquecimentos, foi utilizado como conjunto de referência o *background* experimental correspondente ao total de proteínas de *P. falciparum* identificadas nas replicatas biológicas. Foi aplicado o método de correção de múltiplas comparações g:SCS, com um limiar de significância ajustado para 0,05. As categorias funcionais exploradas abrangeram termos de ontologia gênica relacionados à função molecular (GO:MF), componente celular (GO:CC) e processo biológico (GO:BP), além de vias metabólicas e de sinalização das banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa & Goto, 2000) e REAC (*Reactome*) (Jassal et al., 2020).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fase intraeritrocitária de *P. falciparum* representa um estágio crucial na patogênese da malária, caracterizado por uma profunda remodelação do eritrócito hospedeiro, mediada por centenas de proteínas exportadas pelo parasito. Essas proteínas modificam significativamente as propriedades estruturais e funcionais da célula hospedeira, além de participarem de processos essenciais, como a citoaderência, a evasão da resposta imune e a aquisição de nutrientes, todos indispensáveis para a sobrevivência do parasito e à progressão clínica da infecção. Nesse contexto, a identificação e caracterização das proteínas exportadas que alcançam a membrana plasmática do eritrócito infectado constituem um passo fundamental para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à virulência do parasito, bem como para a descoberta de novos alvos terapêuticos e candidatos vacinais.

No presente estudo, foi empregada uma abordagem integrada que combinou o fracionamento subcelular seletivo com três estratégias complementares de biotinylação, duas químicas e uma enzimática, com o objetivo de enriquecer e analisar de forma sistemática o repertório de proteínas presentes na membrana do eritrócito infectado. Essa estratégia permitiu confirmar a presença de proteínas amplamente caracterizadas, como PfEMP1 e KAHRP, além de identificar um conjunto diversificado de proteínas associadas ao tráfego vesicular, ao citoesqueleto, ao complexo PTEX e a processos metabólicos e de sinalização, muitas das quais permanecem com localização subcelular ambígua.

Embora as limitações técnicas, como possíveis modificações estruturais que podem impedir a ligação eficiente da biotina, a baixa eficiência na eluição e a dificuldade na recuperação devido à insolubilidade de algumas proteínas, tenham restringido a profundidade do perfil proteômico obtido nas amostras enriquecidas, os dados provenientes do fracionamento subcelular na ausência de biotinylação forneceram uma visão abrangente, robusta e funcionalmente coerente do 'membranoma' do eritrócito infectado em estágios tardios do ciclo assexuado

5.1. Isolamento de eritrócitos parasitados por estágios tardios de *P. falciparum* usando gradientes de Percoll®

A obtenção de populações enriquecidas de hemácias parasitadas por *P. falciparum* em estágios específicos é essencial para análises direcionadas. Para isso, empregou-se uma estratégia combinando sincronização com sorbitol a 5% e separação por gradiente de densidade com Percoll® (Chew et al., 2003; Miao & Cui, 2011; Radfar et al., 2009).

O sorbitol promove a lise seletiva de eritrócitos contendo formas maduras, permitindo o controle do estágio predominante no cultivo (Radfar et al., 2009). No presente estudo, a sincronização resultou em uma parasitemia composta principalmente por trofozoítos tardios e esquizontes e enriquecidos por centrifugação em gradiente de Percoll® a 65%, explorando as diferenças de densidade entre os estágios parasitários.

Após a centrifugação, observou-se a estratificação de diferentes populações celulares em camadas discretas, de acordo com suas respectivas densidades de flutuação. As seguintes frações foram identificadas: uma camada superior (A) contendo meio de cultivo e detritos celulares; uma interface intermediária com solução de Percoll® a 35%; uma banda localizada acima da camada de Percoll® a 65% (B), enriquecida em eritrócitos contendo trofozoítos e esquizontes maduros (formas menos densas); e uma camada inferior ou pellet, abaixo do Percoll® a 65% (C), concentrando formas mais densas, como anéis e eritrócitos não infectados. Essa distribuição de densidades encontra-se ilustrada na **Figura 17**.

Esse procedimento resultou em uma amostra com trofozoítos tardios e esquizontes isolados e com viabilidade, adequada para experimentos subsequentes. A abordagem adotada garantiu a eliminação de contaminantes celulares e estágios não desejados.

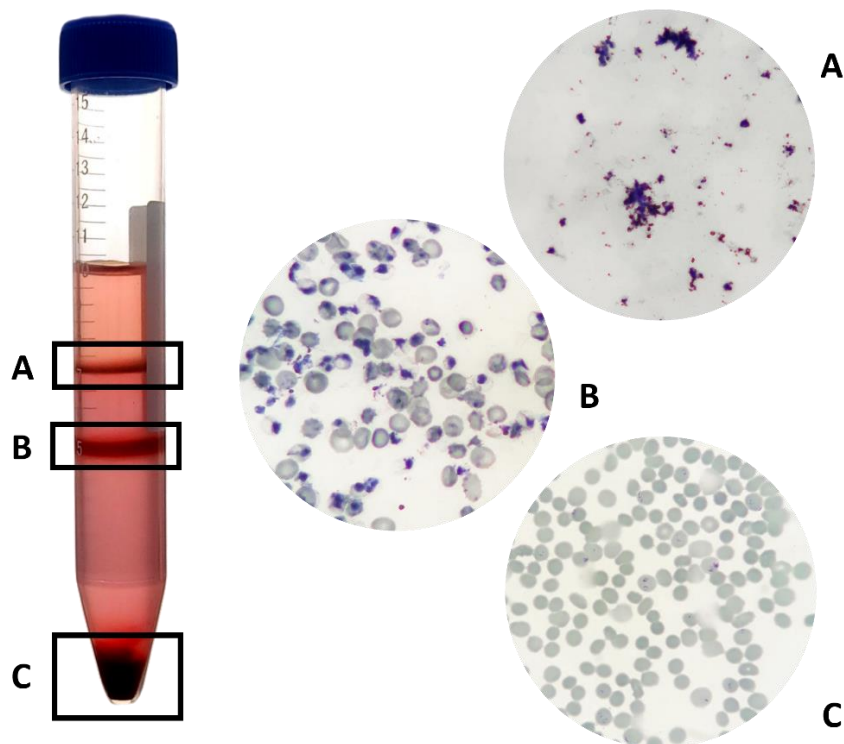


Figura 17. Obtenção das hemácias parasitadas pelas formas maduras de trofozoítos e esquizontes utilizando Percoll® a 65% (v/v). (A) Detritos celulares; Percoll® 35%; (B) Hemácias parasitadas pelas formas maduras menos densas (trofozoítos e esquizontes); Percoll® 65%; (C) Hemácias não parasitadas e hemácias parasitadas pelas formas jovens mais densas (anéis).

5.2. Fragmentação por lise seletiva com estreptolisina O

A análise da membrana da célula hospedeira representa um desafio para os ensaios experimentais, uma vez que os componentes derivados da própria célula são suscetíveis à contaminação por estruturas que não pertencem diretamente à membrana celular infectada pelo *Plasmodium*. Diversas estratégias têm sido empregadas para promover a separação eficiente entre a célula hospedeira do parasito, incluindo lise hipotônica, lise mediada por cloreto de amônio (Martin et al., 1971) ou saponina (Yadavalli et al., 2021). A saponina forma um complexo com o colesterol (Böttger & Melzig, 2013), alterando a permeabilidade da membrana celular (Seeman et al., 1973), o que resulta, na lise seletiva da célula hospedeira. No entanto, um inconveniente importante desse método é que a saponina também permeabiliza a membrana do vacúolo parasitóforo (Ansorge et al., 1997; Yadavalli et al., 2021).

Neste estudo, empregou-se a SLO, uma proteína formadora de poros produzida pela bactéria *Streptococcus pyogenes*, como abordagem alternativa para a permeabilização seletiva da membrana plasmática dos eritrócitos. A SLO interage

especificamente com o colesterol presente nas membranas celulares, formando poros com diâmetros que variam aproximadamente entre 30 e 45 nM (Duncan & Schlegel, 1975). Uma vantagem crucial da SLO é a sua capacidade de permeabilizar a membrana eritrocitária mantendo a integridade da plasmática do parasito e da membrana do vacúolo parasitóforo, que possui menor teor de colesterol (Nyalwidhe et al., 2002).

Após o tratamento com SLO, o conteúdo solúvel do citoplasma eritrocitário (incluindo a hemoglobina e proteínas exportadas solúveis) é liberado e pode ser separado no sobrenadante, enquanto o pellet contém os parasitos, a membrana do vacúolo parasitóforo intacta, e os fragmentos da membrana eritrocitária lisada, juntamente com estruturas vesiculares associadas (Jackson et al., 2007).

A fração obtida por centrifugação (pellet) pós-lise com SLO é enriquecida não apenas com a membrana eritrocitária permeabilizada e estruturas associadas, mas também com outras componentes intracelulares do eritrócito infectado que permanecem insolúveis ou associadas ao parasito, como as proteínas periféricas.

Estudos de microscopia eletrônica e imunolocalização demonstraram que estruturas membranosas complexas induzidas pelo parasito, como as fendas de Maurer e a rede túbulo-vesicular, são preservadas após a permeabilização com toxinas como a equinatoxina II (Jackson et al., 2007), que também age na membrana do hospedeiro de forma lítica.

A análise microscópica da fração parasitária corrobora a eficiência do protocolo de lise e fracionamento. Antes da aplicação da SLO, o esfregaço corado com panótico rápido, revela (**Figura 18A**) hemácias não parasitadas e parasitadas com esquizontes maduros preenchendo completamente o citoplasma do eritrócito, ainda envoltos pela membrana plasmática da célula hospedeira (seta vermelha), com citoplasma azul e núcleos corados em vermelho. Após o fracionamento, a fração é majoritariamente composta por parasitos e suas estruturas associadas incluindo o vacúolo parasitóforo, com escassa presença de hemácias intactas (**Figura 18B**). Esse resultado reflete a especificidade da SLO, que promove a lise seletiva de eritrócitos não infectados em populações mistas, enquanto permeabiliza aqueles infectados, direcionando os parasitos e seus compartimentos para a fração insolúvel.

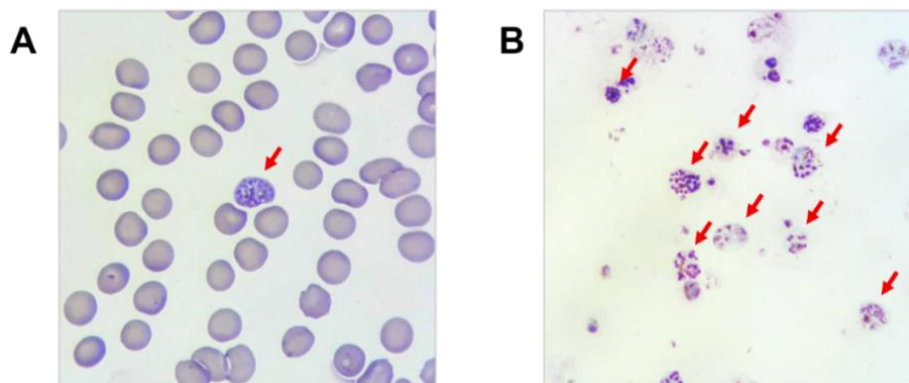


Figura 18. Avaliação morfológica por coloração de panótico rápido antes e após tratamento com estreptolisina O. (A) Esfregaço corado antes da aplicação de SLO. A seta vermelha indica uma hemácia parasitada por um esquizonte maduro preenchendo completamente o citoplasma do eritrócito, ainda envolto pela membrana plasmática da célula hospedeira. Observam-se o esquizonte com citoplasma azulado e núcleos corados em roxo. (B) Esfregaço após lise com SLO. As setas vermelhas indicam esquizontes liberados da membrana eritrocitária e ausência de eritrócitos não parasitados.

5.3. Análise das frações

5.3.1. Identificação proteica nas replicatas experimentais

A identificação proteômica dos eritrócitos infectados por *P. falciparum* foi realizada a partir de três frações subcelulares: membranas, citosólica e parasitária, obtidas por permeabilização seletiva com SLO, seguida de centrifugação diferencial. Para cada fração, foram realizadas três replicatas independentes, desde o preparo amostral até a análise por espectrometria de massas.

As proteínas consistentemente detectadas entre as replicatas foram consideradas de maior robustez analítica e, portanto, prioritárias nas análises subsequentes. Em contraste, aquelas identificadas em apenas uma ou duas replicatas foram classificadas como menos confiáveis, possivelmente devido à baixa abundância ou à variabilidade técnica. As diferenças observadas entre proteínas reprodutíveis e aquelas detectadas de forma esporádica podem resultar tanto de heterogeneidade biológica intrínseca, refletindo flutuações naturais na abundância proteica, quanto de variações na eficiência de extração ou recuperação entre as frações. Dessa forma, as proteínas com maior consistência experimental foram consideradas mais confiáveis e biologicamente relevantes, constituindo o núcleo das análises subsequentes. No conjunto total, 708 proteínas foram identificadas de maneira reprodutível em todas as

frações analisadas, sendo 86 (12,1%) de origem humana (**Anexos 1-3**) e 622 (87,9%) pertencentes ao *P. falciparum* (**Anexos 4-6**).

Na fração membranar, 31 proteínas humanas (20,5%) apresentaram reprodutibilidade, enquanto *P. falciparum* exibiu 260 proteínas (39,1%) (**Tabela 2**). A maior quantidade observada nas proteínas parasitárias pode refletir a intensa exportação de proteínas para a membrana eritrocitária, especialmente em estágios avançados do ciclo intraeritrocitário, como durante o egresso (Alaganan et al., 2017; Paul et al., 2020).

Na fração citosólica, observou-se maior estabilidade na detecção de proteínas humanas, com 22 (73,3%) proteínas identificadas, o que sugere uma composição citoplasmática homogênea, possivelmente associada à presença de eritrócitos não infectados, ricos em hemoglobina (Weatherall et al., 2002). Essa uniformidade contrasta com o citoplasma dos eritrócitos parasitados, que se reduz progressivamente à medida que o parasito ocupa maior volume intracelular (Goldberg et al., 1991). Em contraposição, *P. falciparum* apresentou 26 proteínas citosólicas (39,4%), o que pode refletir menor abundância relativa ou redistribuição dessas proteínas para outras frações, como a membranar (**Tabela 2**).

Tabela 2. Distribuição das proteínas identificadas por espectrometria de massas nas frações subcelulares de eritrócitos infectados por *P. falciparum* e em função da reprodutibilidade por replicata

Fração	Organismo	Única replicata (%)	Duplicatas (%)	Triplicatas (%)
Membranar	Humano	63 (41,7)	57 (37,7)	31 (20,5)
	<i>P. falciparum</i>	222 (33,4)	183 (27,5)	260 (39,1)
Citosólica	Humano	5 (16,7)	3 (10,0)	22 (73,3)
	<i>P. falciparum</i>	26 (39,4)	14 (21,2)	26 (39,4)
Parasitaria	Humano	25 (26,6)	36 (38,3)	33 (35,1)
	<i>P. falciparum</i>	202 (25,3)	257 (32,4)	336 (42,2)
Total	Humano	93 (33,8)	96 (34,9)	86 (31,3)
	<i>P. falciparum</i>	450 (29,5)	454 (29,8)	622 (40,7)

Na fração parasitária, voltada ao isolamento de formas maduras do parasito, 33 proteínas humanas (35,1%) foram detectadas, provavelmente devido à contaminação residual por proteínas eritrocitárias, mesmo após múltiplas etapas de lavagem. Em contrapartida, *P. falciparum* apresentou 336 proteínas (42,2%),

evidenciando eficiência no isolamento e boa representatividade do proteoma intracelular (**Tabela 2**).

5.3.2. Distribuição proteica, compartilhamento e exclusividade entre frações subcelulares

Com o objetivo de visualizar a distribuição e a sobreposição das proteínas identificadas entre as três frações subcelulares analisadas, foi elaborado um diagrama de Venn (**Figura 19**), representando as frações membranas (FM), citoplasmática (FC) e parasitária (FP), tanto para proteínas humanas quanto para aquelas atribuídas ao *P. falciparum*. Essa abordagem permite identificar proteínas exclusivas de cada compartimento, bem como aquelas compartilhadas entre dois ou mais deles, fornecendo informações relevantes sobre sua origem subcelular, localização funcional e possíveis funções biológicas.

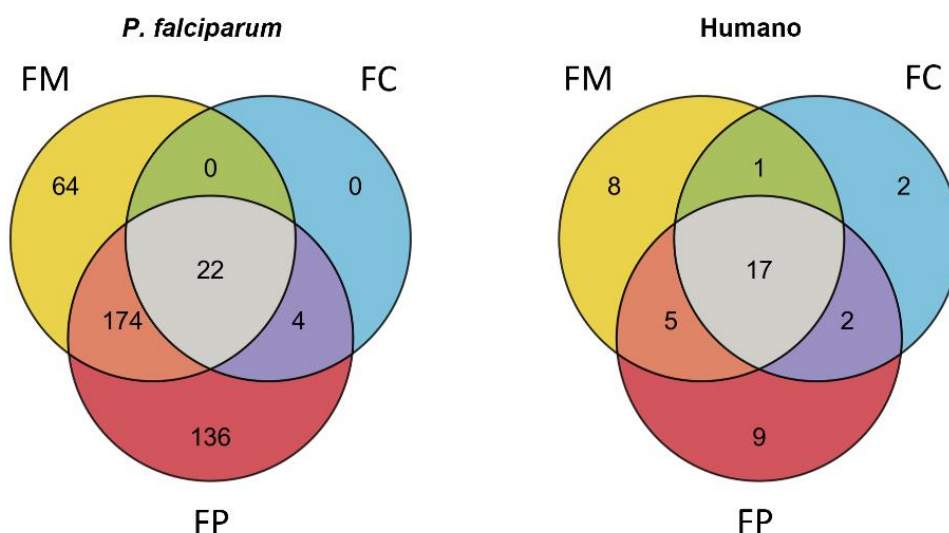


Figura 19. Distribuição das proteínas nas frações celulares. Distribuição e sobreposição das proteínas identificadas entre a fração membranas (FM), citoplasmática (FC) e parasitária (FP), tanto para proteínas humanas quanto para aquelas atribuídas ao *P. falciparum*. Os números indicam proteínas exclusivas ou compartilhadas entre as frações, conforme sua origem e localização experimental.

As 400 proteínas de *P. falciparum* identificadas de forma consistente nas triplicatas experimentais foram distribuídas no diagrama de Venn com base em sua presença nas três diferentes frações subcelulares obtidas. De maneira equivalente, 44 proteínas humanas, foram incorporadas à análise de interseção entre as frações.

No diagrama referente ao *P. falciparum*, observa-se uma predominância significativa de proteínas exclusivas da fração parasitária (FP) do eritrócito infectado, totalizando 136 proteínas (34%). Essa fração representa o universo proteico do parasito confinado no interior do vacúolo parasitóforo, incluindo proteínas residentes no citoplasma, organelas e membranas do próprio parasito. A composição dessa fração reflete não apenas a maquinaria metabólica e estrutural do parasito, mas também moléculas envolvidas em processos críticos como replicação, oferecendo uma visão abrangente do ambiente intracelular do parasito durante o estágio intraeritrocítico.

A fração membranas ocupa a segunda posição em número de proteínas exclusivas, com 64 identificações (16%). Essa fração é composta majoritariamente por proteínas associadas à membrana plasmática do eritrócito hospedeiro, possivelmente, a estruturas exportadas pelo parasito ao citoplasma eritrocítico (fendas de Maurer). A presença dessas proteínas sugere a ocorrência de interações complexas entre o parasito e a célula hospedeira, especialmente em processos de modificação da membrana do eritrócito e formação de estruturas de adesão. Além disso, a identificação de proteínas exclusivamente associadas à fração membranas reforça o potencial dessa subpopulação proteica como alvo para estudos funcionais e intervenções terapêuticas.

Além disso, destaca-se que a maior quantidade de proteínas identificadas foi compartilhada entre a fração membranas e a fração parasitária (FM+FP), com 174 proteínas (43,5%). Essa sobreposição é altamente relevante, uma vez que sugere a presença de proteínas de origem parasitária na membrana do eritrócito, reforçando o envolvimento do sistema de exportação proteica mediado pelo complexo PTEX (Jonsdottir, Gabriela, et al., 2021).

Nas frações FP+FC foram identificadas apenas 4 proteínas (1%), e chama atenção a completa ausência de proteínas exclusivas da fração citoplasmática (0%), bem como de proteínas compartilhadas unicamente entre as frações membranas e citoplasmática. Essa ausência pode ser parcialmente explicada pela possibilidade de que tais proteínas estejam concentradas na interseção entre as frações FM+FP, a qual reúne 174 proteínas. Portanto, a ausência de proteínas na fração FC reflete os limites técnicos da separação subcelular frente à complexa interação entre parasito e célula hospedeira.

A identificação de 22 proteínas (5,5%) presentes simultaneamente nas três frações (FM+FC+FP) indica que certos componentes moleculares exercem múltiplas funções em diferentes compartimentos, participando de processos integrados de transporte, sinalização ou manutenção estrutural.

Na análise das proteínas humanas identificadas entre as frações subcelulares, observou-se um perfil assimétrico, tanto em quantidade quanto em distribuição entre os compartimentos analisados. A maior concentração foi observada na interseção entre as três frações (FM+FC+FP), com 17 proteínas (38,6%), sugerindo a presença de proteínas humanas ubíquas ou altamente abundantes. Grande parte dessas proteínas provavelmente corresponde à hemoglobina (P68871, P69905 e P02042), que, devido à sua estabilidade e alta concentração, permanecem detectáveis mesmo após a ruptura celular ou redistribuição do conteúdo durante o preparo das amostras.

A completa ausência de proteínas compartilhadas exclusivamente entre as frações FM+FC (0%) reforça a hipótese de que moléculas com possível localização dupla nesses compartimentos, possam ter sido incorporadas à fração parasitária durante o processo de fracionamento subcelular. De fato, a interseção entre FM+FP respondeu por 11,4% das proteínas humanas detectadas, o que sugere que a separação por centrifugação levou proteínas eritrocitárias a sedimentar junto com os parasitos cercados da membrana do vacúolo parasitóforo.

A identificação de apenas 44 proteínas humanas, em contraste com as 400 atribuídas ao *P. falciparum*, reflete a marcada diferença de complexidade entre os proteomas do parasito e do hospedeiro. Enquanto os eritrócitos humanos maduros são células anucleadas e terminalmente diferenciadas, com um proteoma limitado e funcionalmente restrito, o parasito exhibe alta atividade biossintética e expressão dinâmica de proteínas ao longo do ciclo intraeritrocitário.

5.4. Proteínas humanas da fração membranas identificadas

A análise proteômica confirma a predominância de proteínas constitutivas do eritrócito (**Anexo 1**), composto em 98% por hemoglobina. As subunidades de hemoglobina alfa, beta, delta, gama-2 e zeta refletem essa abundância, sendo a principal fonte de nutrientes para o parasito durante sua fase intraeritrocítica.

Esses achados são consistentes com os de estudos anteriores que identificaram um extenso conjunto de proteínas citoplasmáticas do eritrócito humano (Kakhniashvili et al., 2004; Roux-Dalvai et al., 2008). A identificação de proteínas

chave do citoesqueleto e enzimas metabólicas, como a proteína Band 3, espectrina alfa/beta, catalase e peroxiredoxina-2, valida o enfoque deste estudo, ao concentrar-se no ambiente modificado pelo parasito. No entanto, a identificação de proteínas de baixa abundância é limitada pelo alto intervalo dinâmico do proteoma, embora métodos de enriquecimento, como a biotinylation, possam mitigar esse desafio.

5.4.1. Modificações estruturais e remodelamento do citoesqueleto do eritrócito

Os resultados confirmam a presença de componentes essenciais do citoesqueleto e proteínas integradas, como a proteína integral de membrana Band 3 (B3AT), uma das mais abundantes na superfície do eritrócito, desempenha um papel essencial no transporte de ânions e na organização estrutural da célula (Lux et al., 1989). Essa proteína forma macrocomplexos com a anquirina e interage indiretamente com a α -espectrina (SPTA) e a proteína 4.1 (EPB41), ancorando o citoesqueleto à membrana plasmática (Charneau et al., 2024). A presença de interações entre proteínas do parasito, como MSP1, e a Band 3 já foi demonstrada, sugerindo um mecanismo ativo de subversão estrutural e funcional da célula hospedeira (Kariuki et al., 2005). Além disso, a proteína 4.1 e a proteína 4.2 (EPB42), responsáveis pela ancoragem do esqueleto de espectrina à membrana, interagem com proteínas parasitárias, como a EBA181, sugerindo mecanismos redundantes de adesão (Lanzillotti & Coetzer, 2006).

A proteína 4.1, em particular, funciona como um elo de ligação entre múltiplos componentes da membrana e do citoesqueleto, sendo sensível à regulação por fosforilação (Chishti et al., 1994; Conboy et al., 1986). A cooptação dessas proteínas estruturais pelo parasito —por meio da ação de proteínas exportadas como RESA (ring-infected erythrocyte surface antigen) e MESA— resulta em modificações profundas na arquitetura da célula hospedeira, com impacto direto sobre sua rigidez e capacidade de citoaderência.

A anquirina (ANK1) atua como um eixo organizador central ao conectar a Band 3 à rede de α -espectrina e PHISTa (Plasmodium helical interspersed subtelomeric), sendo indispensável para a manutenção da estabilidade mecânica do eritrócito infectado (Shakya et al., 2017; Vallese et al., 2022).

As glicoforinas, particularmente a GYPA, constituem receptores chave para a entrada do parasito (Sim et al., 1994). A interação entre proteínas do merozoíto, como

MSP1 e EBA175, com GYPA demonstra a importância dessa glicoproteína como ponto de ancoragem crítico durante a invasão (Pasvol et al., 1982). Sua associação com a Band 3 ressalta a convergência funcional desses receptores para facilitar a entrada e o estabelecimento do parasito.

5.5. Proteínas do *P. falciparum* da fração membranar identificadas em processos associados ao ciclo intraeritrocitário

A identificação de proteínas em frações de membrana constitui uma abordagem robusta para a análise de componentes envolvidos em interações moleculares complexas nas interfaces críticas para a proliferação do parasito. A lista de 260 proteínas identificadas (**Anexo 7**) revela um repertório funcionalmente diverso, abrangendo desde processos de invasão e remodelamento do hospedeiro até atividades metabólicas e de sinalização. Particularmente, as proteínas localizadas na membrana plasmática (**Figura 20**) apresentam elevada relevância biológica por mediar o contato direto entre o parasito e o ambiente extracelular, desempenhando papéis centrais na adesão, na evasão imune e na modulação da célula hospedeira. Por estarem acessíveis ao sistema imunológico e a compostos farmacológicos, essas proteínas configuram-se como os alvos mais promissores para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e vacinais contra a malária, conforme demonstrado por estudos que evidenciam a eficácia de abordagens voltadas a antígenos de superfície e proteínas exportadas (Chan et al., 2014; Florens et al., 2004; Nilsson Bark et al., 2018).

A análise proteômica das frações subcelulares evidenciou a predominância de proteínas parasitárias associadas à membrana plasmática, incluindo PfEMP1 e KAHRP, cuja presença corrobora estudos clássicos que descreveram esses componentes como elementos centrais da remodelação eritrocitária e da citoaderência endotelial (Alexandra Rowe et al., 1997; Goel et al., 2015; Leech et al., 1984; Niang et al., 2014; Y. D. Sharma, 1997; Smith et al., 1995). Em consonância com estudos que utilizaram abordagens de espectrometria de massas (Batinovic et al., 2017; Charneau et al., 2024).

5.5.1. Proteínas exportadas e o remodelamento do eritrócito

Após a invasão, o parasito exporta um conjunto expressivo de proteínas para o citoplasma do eritrócito, promovendo profundas modificações estruturais e funcionais.

Muitas dessas proteínas interagem com membranas e com o citoesqueleto do hospedeiro. KAHRP (KAHSP40) e PfEMP3 são exemplos de proteínas associadas às protuberâncias (*knobs*) da superfície do eritrócito infectado, que facilitam a citoaderência ao endotélio vascular (P. Acharya et al., 2012; Grüner et al., 2001). KAHRP, localizada nas fendas de Maurer e nos próprios knobs, interage extensivamente com elementos do citoesqueleto, como α/β -espectrina, proteína 4.1, banda 3 e GYPC, formando complexos com PfEMP1 (Y. D. Sharma, 1997). Sua detecção na fração membranar reflete essas interações múltiplas. RESA também interage com a α -espectrina, estabilizando sua forma tetramérica, sendo liberada na junção apertada durante a invasão (Pei et al., 2007). A presença de RESA e RESA3 reafirma sua associação com estruturas membranares e citoesqueléticas. Apesar de GLURP (glutamate-rich protein) ser tradicionalmente descrita como uma proteína secretada (Borre et al., 1991), sua detecção nesta fração pode indicar associação periférica ou transitória com membranas durante a exportação.

5.5.2. Proteínas envolvidas no tráfego vesicular e membranas

O transporte intracelular de proteínas e lipídios no parasito envolve uma rede dinâmica de vesículas e compartimentos membranares. A identificação de proteínas como RAB18 (ras-related protein Rab-18), RAB1B (GTPases RAB) e YKT6.2 (V-SNARE) sugere atividade de vias de tráfego vesicular associadas ao retículo endoplasmático, complexo de Golgi, fendas de Maurer ou vesículas parasitárias (Quevillon et al., 2003). RAB GTPases regulam formação e ancoragem vesicular (Coppens & Romano, 2020), enquanto SNAREs mediam fusão com membranas-alvo (Bisio et al., 2020). VP1 (V-type H(+)-translocating pyrophosphatase) aproveitam a energia livre da hidrólise do pirofosfato inorgânico para gerar gradientes transmembranares de prótons, tanto na membrana plasmática quanto em estruturas intracelulares (McIntosh et al., 2001), reforçando sua relevância na manutenção do potencial de membrana em condições de limitação energética. A tRIP (tRNA import protein) está ancorada à membrana plasmática do parasito e é responsável pela importação de tRNAs exógenos do hospedeiro. A ausência dessa proteína compromete significativamente a aptidão do estágio eritrocítico do parasito, sugerindo que *P. falciparum* pode depender de tRNAs do hospedeiro para sustentar sua própria tradução proteica e/ou regular processos pós-transcricionais por meio de RNAs regulatórios (Bour et al., 2016).

5.5.3. Enzimas ligadas ao metabolismo lipídico

O metabolismo lipídico desempenha um papel fundamental na biogênese de novas membranas e na expansão do parasito (Baumeister et al., 2006). A identificação das acil-CoA sintetases ACS10 e ACS11 sugere sua possível participação na ativação de ácidos graxos nas proximidades dessa estrutura. Esse processo é essencial para o crescimento do parasito, conforme demonstrado por estudos anteriores (Bethke et al., 2006; Matesanz et al., 1999).

5.5.4. Sinalização mediada por fosforilação

A fosforilação e desfosforilação de proteínas, catalisada por quinases e fosfatases, são mecanismos regulatórios chave em muitos processos celulares do parasito, incluindo a invasão e o egresso. A identificação de CDPK1 (calcium-dependent protein kinase 1), PKAc (cAMP-dependent protein kinase) e PPM2 (protein phosphatase) e na fração membranar é consistente com seus papéis potenciais na sinalização associada a membranas. Estudos de fosfoproteômica têm evidenciado uma ampla sinalização mediada pela proteína PKA no estágio de esquizonte (Lasonder et al., 2012). A detecção da subunidade catalítica da PKA (PKAc) na membrana sugere a ativação ou o ancoramento dessa quinase nas proximidades de efetores de membrana, o que poderia facilitar a modulação de respostas rápidas, como a lise da membrana no egresso dos merozoítos (Alam et al., 2015).

Além disso, a CDPK1, uma quinase dependente de cálcio, desempenha um papel central na regulação da motilidade e na saída do parasito em *Apicomplexa* (Bansal et al., 2013; Kumar et al., 2017). Sua associação com membranas é bem estabelecida (Zhao et al., 1994) e sugere sua participação direta na regulação da permeabilização e do remodelamento da membrana do hospedeiro. A presença de outras quinases e fosfatases na fração membranar sugere que a regulação da atividade de proteínas associadas a membranas por fosforilação/desfosforilação é um aspecto importante da biologia do parasito.

A detecção concomitante de PP1, SERA5 e pTKL na fração membranar é particularmente relevante devido às interações previamente descritas entre essas proteínas (Gnangnon et al., 2019). O pTKL foi mostrado interagir com a fosfatase de serina/treonina PP1, mediada por motivos RVxF, e com SERA5 por meio de seu domínio SAM (sterile alpha motif) (Gnangnon et al., 2019). SERA5 é a pseudo-protease mais abundante na vacúolo parasitóforo, desempenhando um papel crucial

na regulação da cinética e eficiência da saída do parasito do eritrócito (Collins et al., 2017). Tradicionalmente, SERA5 é considerada uma proteína residente na vacúolo parasitóforo, sendo um marcador de uma fração distinta em experimentos de permeabilização (Hasan et al., 2023). No entanto, sua detecção na fração membranar e sua associação direta com pTKL sugerem que, nos estádios tardios do ciclo (trofozoito/esquizonte), esse complexo regulatório (pTKL/SERA5/PP1) esteja envolvido na preparação do processo de ruptura e liberação dos merozoítos. De fato, SERA5 foi identificada em estudos de proximidade (APEX2) como uma proteína que se biotinila nas imediações da proteína KAHRP e confirma sua proximidade física com a membrana do eritrócito (Charneau et al., 2024).

5.5.5. Maquinaria de síntese e degradação proteica

Elementos da tradução e degradação de proteínas também foram identificados, incluindo os fatores de iniciação eucariótico (eIF2 α , eIF3A-M, eIF4E) que são cruciais para controlar o reconhecimento do cap e o recrutamento do ribossomo ao mRNA (Shaw et al., 2007). Destacam-se também proteínas ribossomais RPL2, RPL23 e RPL38, essenciais para a montagem e estabilidade da subunidade ribossômica grande (Wong et al., 2014).

No que tange à degradação proteica, identificaram-se subunidades reguladoras do proteassoma 26S, como RPT1, RPN2, RPN3 e RPN7, componentes da partícula reguladora responsáveis por reconhecer proteínas ubiquitinadas e facilitar seu direcionamento ao núcleo catalítico (Aminake et al., 2012).

Nossos resultados são consistentes com os reportados por Gnanngnon et al. (2019), que, por meio de imunoprecipitação e espectrometria de massas, detectaram membros do complexo do proteassoma entre as proteínas que interagem com a pseudokinase *PbPTKL* na membrana de eritrócitos infectados por *P. berghei*. Essa correspondência sugere que, embora o proteassoma seja uma estrutura predominantemente citoplasmática, algumas de suas subunidades podem formar complexos estáveis associados à membrana no citoplasma do eritrócito hospedeiro. Nesse contexto, o proteassoma estaria envolvido no controle de qualidade e na regulação do ciclo celular em *Plasmodium*.

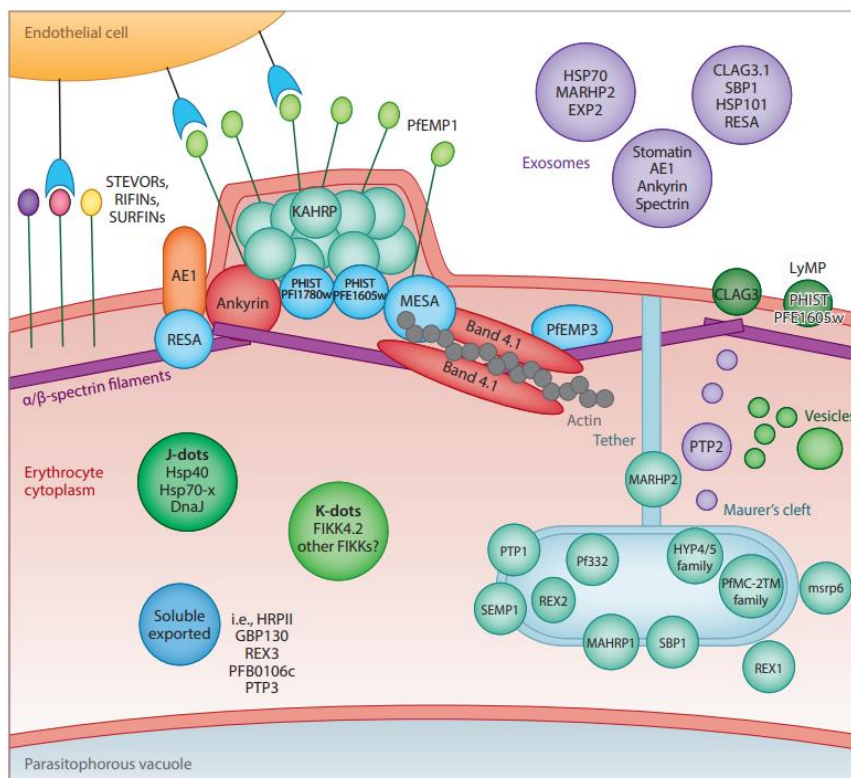


Figura 20. Localização das proteínas exportadas na membrana. A adesina *PfEMP1* é exposta na superfície das hemácias parasitadas, concentrando-se em estruturas salientes denominadas “*knobs*”, compostas principalmente por KAHRP. A RESA interage com a anquirina no complexo anquirina–AE1, enquanto a MESA associa-se à *PfEMP1* no complexo de junção Band 4.1. As proteínas *PfEMP1*, STEVORs e, possivelmente, RIFINs e SURFINs, participam da adesão do eritrócito infectado às células endoteliais. Além disso, observam-se múltiplos compartimentos vesiculares, incluindo a formação de exossomos originados a partir das fendas de Maurer. Esses componentes refletem a complexa organização e dinâmica do sistema de exportação proteica em *Plasmodium falciparum*, essencial para a remodelação da célula hospedeira e para os mecanismos de citoadesão e evasão imune. Fonte: (Spillman et al., 2015)

5.6. Proteínas do merozoíto associadas ao processo de invasão

Ao serem enriquecidos por Percoll®, alguns esquizontes podem sofrer ruptura e liberar merozoítos, iniciando o processo de invasão. Nessa condição, tornam-se detectáveis proteínas características dessa fase, as quais não representam componentes autênticos da fração membranar analisada. Portanto, sua presença deve ser interpretada com cautela, pois não corresponde a alvos genuínos de superfície dos eritrócitos infectados. Ainda assim, tais proteínas permanecem biologicamente relevantes, considerando que determinadas proteínas apresentam atividade multifuncional durante o ciclo do parasito (Kehrer et al., 2024).

5.6.1. Proteínas essenciais para a invasão e organelas apicais

Um subconjunto proeminente de proteínas identificadas nesta fração (**Anexo 7**) está intimamente relacionado ao processo de invasão dos eritrócitos, em consonância com a fase tardia do ciclo em que os parasitos foram coletados. Entre essas proteínas, destaca-se a AMA1, localizada nos micronemas e dotada de domínio transmembranar, que atua diretamente no processo de invasão (Bargieri et al., 2013). De maneira análoga, foram detectadas proteínas de roptria como CLAG9 e RON3. CLAG9 componente do complexo CLAG9-RHOPH é translocada para o eritrócito após a invasão, associando-se à formação de canais de nutrientes e à citoaderência (Goel et al., 2010; Ling et al., 2004).

RON3, por sua vez, integra um complexo essencial para a invasão do eritrócito e o desenvolvimento do parasito no estágio anelar. Estudos recentes demonstram que o fragmento C-terminal de RON3 participa da formação de um canal permeável a nutrientes na membrana do vacúolo parasitóforo, facilitando o transporte de proteínas do parasito do plasma para a membrana do vacúolo parasitóforo, o que corrobora o papel de RON3 na instalação das vias de aquisição de nutrientes em estágios iniciais da infecção (Ito et al., 2023). Além disso, foi identificado por imunoprecipitação um complexo composto por RAMA e RON3 (Ito et al., 2021).

5.6.2. Componentes do motor actomiosínico e do citoesqueleto

O motor actomiosínico, composto principalmente pela miosina A (MYOA) e pela proteína MTIP (myosin tail domain interacting protein), é essencial para a motilidade e invasão do parasito da malária no hospedeiro (Bergman et al., 2003; Bosch et al., 2006; J. L. Green et al., 2006; Pinder et al., 1998). Esse complexo, denominado glideosoma, é conservado em todas as fases do ciclo de vida do parasito e presente em outros apicomplexos como *Toxoplasma gondii* (Baum et al., 2006).

O glideosoma é ancorado à membrana interna por proteínas estruturais chamadas GAP (glideosome-associated protein), entre elas GAP45, GAP40 e GAP50, em especial, conecta o complexo de membrana interna à membrana plasmática por modificações lipídicas (He et al., 2023; Perrin et al., 2018). A força gerada pelo motor é transmitida às adesinas transmembrana, como EBA e AMA1, arrastando-as posteriormente e promovendo a invasão celular. A aldolase, por sua vez, conecta as adesinas ao citoesqueleto de actina F (Cowman et al., 2017).

5.7. Integração de banco de dados de membranas e estratégias terapêuticas na infecção por *P. falciparum*

A identificação de proteínas imunogênicas é essencial para acelerar o desenvolvimento de vacinas e aprimorar a compreensão dos mecanismos subjacentes à imunidade natural adquirida, além de possibilitar o desenvolvimento de estratégias imunológicas que possam conferir proteção duradoura contra o *Plasmodium* (Asghari et al., 2021; Crompton et al., 2014).

Um estudo realizado por Peter D. Crompton e colaboradores (Crompton et al., 2010) desenvolveu um microarranjo de proteínas contendo 1204 proteínas conhecidas e hipotéticas (aproximadamente 23% do proteoma de *P. falciparum*). Esse microarranjo foi utilizado para analisar plasma de 220 indivíduos, identificando 491 proteínas imunogênicas. A comparação dos nossos achados com essas proteínas possibilita a seleção e o foco da pesquisa nas proteínas que demonstraram ser alvos do sistema imunológico em indivíduos capazes de controlar a infecção de maneira assintomática, um critério fundamental para o desenvolvimento de vacinas (Crompton et al., 2014; Williams et al., 2024).

Para a análise, foram consideradas as proteínas membranares provenientes das banco de dados *in silico*, experimentais e da PlasmoDB HT-PTEX, juntamente com 36 proteínas de superfície eritrocitária previamente identificadas por Laurence Florens e colaboradores (Florens et al., 2004). Além disso, foram incluídas as proteínas exclusivas da fração parasitária que contêm o motivo de exportação HT-PTEX, sugerindo uma possível participação nos mecanismos de translocação de proteínas para o hospedeiro. As proteínas identificadas foram comparadas com 64 proteínas exclusivas da fração membranares, 136 proteínas atribuídas à fração parasitária com motivo PEXEL-HT e 174 proteínas presentes na interseção entre as frações membranares e parasitária.

Considerando o potencial interesse biológico dos alvos, priorizaram-se as proteínas simultaneamente detectadas nas frações analisadas e que possuíssem anotação em pelo menos uma das banco de dados selecionadas. A seleção excluiu as proteínas já caracterizadas por Laurence Florens e colaboradores, quando presentes, com o intuito de direcionar a análise para alvos ainda não amplamente explorados na literatura. Essas proteínas, no entanto, foram discutidas de forma mais detalhada em seção posterior.

PfEMP1 facilita a evasão imunológica do hospedeiro, sendo sua alta imunogenicidade e indução rápida de anticorpos características esperadas devido ao seu papel central na interação com o sistema imunológico (Wahlgren et al., 2017).

Por outro lado, a proteína M1AAP (*PfA-M1*) é considerada um alvo quimioterapêutico promissor para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos, em virtude de seu papel essencial no ciclo de vida de *P. falciparum*. Trata-se de uma aminopeptidase expressa durante o estágio eritrocítico do parasito (Azimzadeh et al., 2010). O inibidor T5, um derivado da amino-benzosuberona, validou a M1AAP como um alvo quimioterapêutico crucial, ao demonstrar que o bloqueio seletivo da M1AAP é suficiente para inibir o crescimento e o desenvolvimento do parasito tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Flipo et al., 2007).

Diversos inibidores com alta potência e atividade *in vivo* já foram identificados para essa enzima (Bounaadja et al., 2017). Além disso, algoritmos de modelagem estrutural, como o AlphaFill (Hekkelman et al., 2023) empregam similaridade de sequência e estrutura para transferir pequenas moléculas ou íons de estruturas experimentais para modelos proteicos preditos, permitindo associar diferentes compostos com base na similaridade estrutural e funcional da proteína. No caso da M1AAP, foram descritos 14 inibidores associados, dos quais quatro (códigos RCSB: TOD, J4V, BB2 e B3P) ainda não possuem literatura correlata disponível.

5.8. Perfis funcionais e organização em clusters de proteínas da membrana do eritrócito infectado

Os resultados do agrupamento funcional das 260 proteínas presentes na fração membrana de eritrócitos infectados por *P. falciparum* evidenciam a organização molecular estabelecida pelo parasito durante as fases de trofozoíto tardio e esquizonte. Foram agrupadas 105 proteínas, distribuídas em 13 clusters distintos (**Figura 22, Anexo 9**). A análise dessas 260 proteínas revelou clusters com especializações claras em processos como remodelamento do eritrócito, invasão, aquisição de nutrientes, adesão e tráfego proteico, indicando uma divisão funcional e coordenada entre os diferentes componentes do proteoma associado à membrana, processos esses que foram explicados nas seções subsequentes.

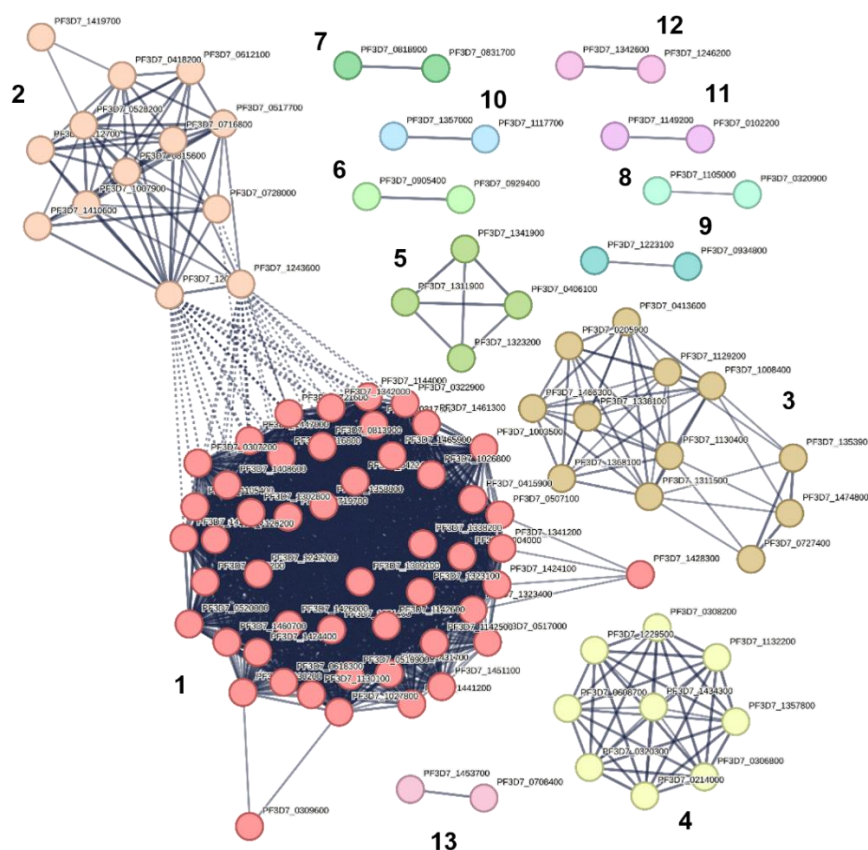


Figura 22. Rede de interação proteína-proteína gerada com STRING. As interações foram agrupadas por MCL, formando clusters funcionais relacionados. Arestas representam interações previstas e nós representam proteínas codificadas pelos genes analisados.

5.8.1. O core Funcional do parasito e a dinâmica de exportação

A predominância de proteínas associadas à maquinaria de síntese proteica nos clusters 1 (50 proteínas) e 2 (13 proteínas) é notável. Embora o *Plasmodium* apresente um proteoma no ambiente parasitário (delimitado pela membrana plasmática do parasito), e tais componentes sejam essenciais ao seu desenvolvimento, a detecção de proteínas ribossomais na periferia celular ou em vesículas (cluster 1) deve ser interpretada com cautela. Siau e colaboradores, em seu atlas proteômico espacial comparativo, observaram que proteínas ribossomais, como a subunidade 60S L7-3, foram por vezes preditas com um padrão “vesícula”, provavelmente refletindo a elevada conservação estrutural (Siau et al., 2023).

A eficácia do dobramento e do tráfego de proteínas é evidenciada pelo cluster 4, que inclui processos cruciais como a cooperação entre PDCL e TRiC/CCT no dobramento da proteína beta G. Proteínas de dobramento (chaperonas) são componentes essenciais no remodelamento do eritrócito e na maquinaria de

exportação. Por exemplo, o HSP101 e outras chaperonas são fundamentais para o PTEX. Sferra e colaboradores identificaram um core de 70 proteínas compartilhadas entre esquizontes e gametócitos, nas quais proteínas envolvidas em dobramento e transporte ocupam uma posição central e altamente interconectada nas redes de interação (Sferra et al., 2025). Em esquizontes tardios, as proteínas de dobramento apresentaram perfis de flotação predominantemente conservados em microdomínios de membrana, evidenciando a estabilidade funcional desse conjunto proteico ao longo da transição do trofozoíto para o esquizonte.

5.8.2. Mecanismos de transporte e modificação da membrana

O cluster 5 está ligado à hidrólise de GTP e ao complexo ATPase tipo V transportador de prótons. A V-ATPase é uma bomba de H⁺ essencial para a homeostase de pH, localizada na membrana plasmática do parasito e vacúolo digestivo (Wunderlich, 2022). O cluster 9 inclui o transporte mediado por aquaporina. As aquaporinas são canais transportadores de água, glicerol e polióis. O transporte de solutos e a permeabilidade da membrana são funções vitais para o crescimento rápido do parasito, sustentando a elevada demanda metabólica durante o ciclo intraeritrocítico (Wunderlich, 2022).

Os clusters 6 e 12 representam proteínas diretamente associadas à citoaderência e que participam tanto da organização do citoesqueleto do parasito quanto da modulação do citoesqueleto do hospedeiro, uma característica central da patogênese de *P. falciparum*. A localização dessas proteínas no cluster de membrana é consistente com o extenso processo de remodelação que leva à exportação de fatores de virulência, como o PfEMP1, para a superfície do eritrócito, frequentemente mediado por estruturas especializadas como as fendas de Maurer (Alexandra Rowe et al., 1997; Bekić & Kilian, 2023; Siau et al., 2023).

5.8.3. Regulação, replicação e mecanismos desconhecidos

A identificação dos clusters 7 e 8 aponta para processos regulatórios centrais. Sferra e colaboradores observaram que fatores de licenciamento da replicação do DNA são expressos no estágio de trofozoíto, mas são recrutados exclusivamente para microdomínios de membrana durante os estágios iniciais do esquizonte, quando a replicação é mais intensa (Sferra et al., 2025). Esse padrão ilustra a regulação espacial e temporal imposta pelo parasito, na qual o direcionamento de proteínas a

microdomínios de membranas ocorre de forma independente dos níveis de expressão, refletindo um controle fino sobre a progressão do ciclo celular.

Os clusters 3 e 11 indicam o papel dos mecanismos de degradação e modificação de proteínas, essenciais para o ciclo de vida acelerado do parasito e para o processamento de antígenos, destacando a importância desses sistemas para a adaptação rápida e a manutenção da homeostase proteica (Anaguano et al., 2023).

5.9. Análise funcional de enriquecimento da fração membranárea por termos de ontologia gênica (GO):

Todos os dados foram baseados nas 260 proteínas de *P. falciparum* da fração membranárea (**Anexo 4**). A análise revelou termos significativamente enriquecidos nas três categorias principais: função molecular (GO:MF), processos biológicos (GO:BP) e componentes celulares (GO:CC), além de vias metabólicas do KEGG e REAC (**Figura 23, Anexo 10**). Esses resultados destacam aspectos críticos da biologia do parasito, particularmente sua maquinaria de tradução e metabolismo proteico, que são essenciais para sua sobrevivência e virulência.

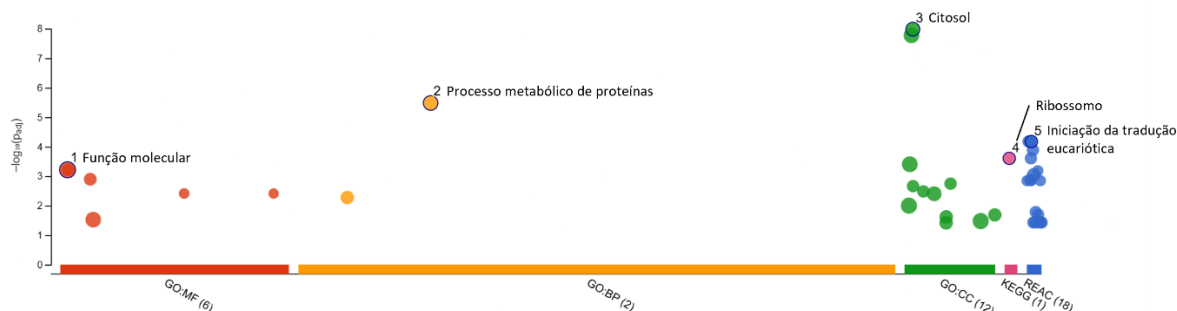


Figura 23. Análise funcional por enriquecimento de termos de ontologia gênica (GO) e vias metabólicas. O gráfico resume os termos significativamente enriquecidos nas categorias de função molecular (GO:MF), processos biológicos (GO:BP) e componentes celulares (GO:CC), além de vias do KEGG e Reactome (REAC), a partir das proteínas identificadas nas frações subcelulares.

5.9.1. Função molecular e estrutura ribossomal

Um dos achados mais notáveis é o enriquecimento de termos relacionados à função ribossomal, como "constituente estrutural do ribossomo" (GO:0003735) e "atividade de molécula estrutural" (GO:0005198). Tais termos estão associados a uma quantidade substancial de transcritos, indicando que o parasito investe significativamente na síntese de proteínas, um processo vital para seu crescimento e replicação dentro dos eritrócitos (Van Spaendonk et al., 2001). Além disso, termos

como "chaperona de dobramento de proteínas" (GO:0044183) e "chaperona dependente de ATP" (GO:0140662) sugerem que o parasito possui mecanismos robustos para garantir o correto dobramento de proteínas, especialmente em condições de estresse, como as encontradas no hospedeiro humano (Dutta et al., 2022).

5.9.2. Processos biológicos enriquecidos

Na categoria de processos biológicos, o termo "processo metabólico de proteínas" (GO:0019538) se destaca com o menor valor de p ajustado ($5,48 \times 10^{-6}$), indicando uma alta relevância estatística. Isso reflete a importância do metabolismo proteico para o parasito, desde a síntese até a degradação de proteínas. O termo "tradução" (GO:0006412) também aparece como altamente enriquecido, corroborando a ênfase do parasito na produção de proteínas. Esses processos são fundamentais para a rápida proliferação do parasito durante a fase sanguínea da infecção, quando ele precisa sintetizar grandes quantidades de proteínas para invadir novas células hospedeiras (Castellano et al., 2024).

5.9.3. Componentes celulares e localização

Em termos de componentes celulares, o "citossol" (GO:0005829) e o "citoplasma" (GO:0005737) são os termos mais significativos, com valores de p extremamente baixos ($1,04 \times 10^{-8}$ e $1,68 \times 10^{-8}$, respectivamente). Isso indica que a maioria das proteínas enriquecidas está localizada nessas regiões, onde ocorrem processos essenciais como a tradução e o dobramento de proteínas. Além disso, termos como "subunidade ribossomal" (GO:0044391) e "ribossomo" (GO:0005840) reforçam a centralidade da maquinaria de tradução na biologia do parasito. A presença de termos como "complexo ribonucleoproteico" (GO:1990904) sugere ainda a importância de interações entre RNA e proteínas para a regulação gênica. Estes dados refletem a massiva inversão do parasito na síntese e no processamento de proteínas, processos fundamentais para sua rápida proliferação e patogenicidade durante a fase sanguínea de la infección (Bozdech, Llinás, et al., 2003).

5.9.4. Vias metabólicas

A análise funcional revelou um enriquecimento significativo de vias relacionadas à tradução proteica no parasito, com destaque para o metabolismo

ribossomal (KEGG:03010) e processos fundamentais da iniciação e alongação da tradução, como “GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit” (REAC:R-PFA-72706), “eukaryotic translation initiation” (REAC:R-PFA-72613) e “Cap-dependent translation initiation” (REAC:R-PFA-72737), indicando que o parasito depende de uma maquinaria de tradução altamente funcional (Pestova et al., 2001). A formação do complexo 43S, o escaneamento ribossomal e o reconhecimento do códon de início (REAC:R-PFA-72702), bem como a junção das subunidades 40S/60S, são eventos críticos para garantir a fidelidade da síntese proteica (Wong et al., 2017).

Vias associadas à alongação da cadeia polipeptídica (REAC:R-PFA-156842; REAC:R-PFA-156902) e à formação de complexos de iniciação (REAC:R-PFA-72649 e R-PFA-72695) sugerem um controle rigoroso sobre a dinâmica translacional. Além disso, mecanismos regulatórios como a via de silenciamento translacional mediado por L13a (REAC:R-PFA-156827) apontam para estratégias do parasito em modular seletivamente a expressão gênica em resposta a estímulos intraeritrocitários (LaCount et al., 2005). A presença de vias de processamento e maturação de rRNA (REAC:R-PFA-72312, R-PFA-6791226, R-PFA-8868773) reforça a complexidade da biogênese ribossomal no parasito, essencial para a montagem eficiente dos ribossomos 80S (Wong et al., 2014).

Finalmente, a inclusão do metabolismo proteico global (REAC:R-PFA-392499) e do metabolismo de selenoaminoácidos (REAC:R-PFA-2408522) indica que o parasito mantém um controle integrado entre tradução, processamento e homeostase proteica (D. Acharya et al., 2025). Esses achados ressaltam a importância da maquinaria translacional como eixo central da biologia do parasito e potencial alvo para o desenvolvimento de terapias antimaláricas.

5.10. Marcação seletiva por biotilação para enriquecimento de proteínas de superfície

A caracterização do “membranoma” de *P. falciparum* representa um desafio técnico, a identificação precisa e sensível dessas proteínas requer abordagens que superem limitações tradicionais, como a baixa abundância, nesse contexto, métodos baseados em biotilação seletiva emergem como ferramentas poderosas para o enriquecimento e mapeamento espacial de proteínas de membrana. Entre essas estratégias, a tecnologia APEX2 (enhanced ascorbate peroxidase 2) destaca-se pela

sua capacidade de rotular proteínas próximas em células vivas com resolução espacial 269 ± 41 nm e resolução temporal de segundos (Quintero-Ferrer et al., 2025).

A aplicação da APEX2 em parasitologia, particularmente em *P. falciparum*, é ainda incipiente, mas altamente promissora. Recentemente, Charneau et al. (2024) demonstraram, a viabilidade do uso de APEX2 em eritrócitos infectados, utilizando a técnica para identificar interações da KAHRP. Esse estudo pioneiro não apenas validou a funcionalidade da APEX2 no contexto da malária, mas também revelou uma rede de proteínas exportadas e componentes do citoesqueleto eritrocitário que interagem espacialmente com a KAHRP, oferecendo novas perspectivas sobre a arquitetura dos knobs e os mecanismos de ancoragem de ligantes de adesão como a PfEMP1.

No presente trabalho, expandimos essa abordagem inovadora ao empregar a APEX2 recombinante como ferramenta exógena para biotinylation direcionada da superfície de eritrócitos infectados por formas tardias de *P. falciparum*. Paralelamente, utilizamos sondas químicas tradicionais —Sulfo-NHS-LC-Biotina e Maleimida-PEG2-Biotina— para se complementar os métodos baseados em química clássica e aqueles baseados em proximidade. Essa estratégia integrada visa não apenas enriquecer e identificar proteínas de superfície com alta especificidade, mas também validar achados proteômicos obtidos por fracionamento subcelular, superando limitações de sensibilidade e aumentando a confiança na atribuição de localização subcelular.

5.10.1. Produção da APEX2 recombinante para aplicação em biotinylation seletiva

A eficiência da biotinylation seletiva mediada por APEX2 depende diretamente da obtenção de uma enzima funcional. Nesta etapa, foram conduzidos ensaios para a produção, purificação e validação da APEX2 recombinante (APEX2rec), com o objetivo de assegurar sua integridade estrutural e atividade antes da aplicação nos experimentos de marcação de superfície.

5.10.1.1. Expressão heteróloga da APEX2 recombinante e purificação por cromatografia de afinidade

Uma vez que a APEX2rec foi expressa em *E. coli* (processo previamente validado, dados não publicados), procedeu-se à purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. Com o objetivo de validar a estratégia de purificação

adotada e confirmar a recuperação da APEX2rec, foi realizada análise eletroforética das frações eluídas ao longo do processo (**Figura 24**). Na fração não ligada (poço 1), observa-se um padrão complexo de bandas, compatível com a presença de proteínas solúveis do lisado celular que não interagiram com a matriz de afinidade, indicando que proteínas não específicas foram eficientemente descartadas nesta etapa inicial.

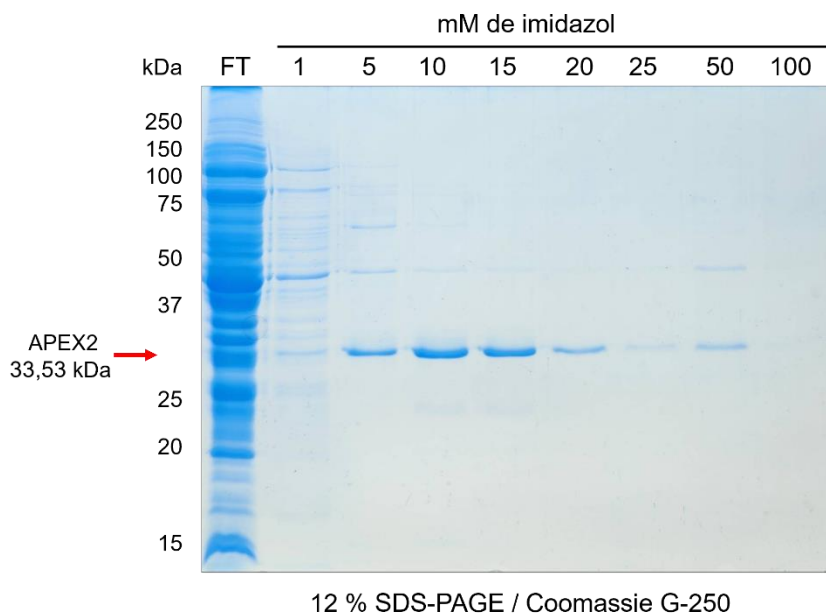


Figura 24. Purificação da APEX2 recombinante por cromatografia de afinidade com níquel. Representação da análise eletroforética em gel de poliacrilamida a 12% corado com Coomassie Blue. Foram aplicados 10 μ l de cada amostra por poço. As amostras correspondem a: (**FT**) fração não ligada ("Flow-through") contendo a fração solúvel; (**1**) tampão de equilíbrio/lavagem contendo 1 mM de imidazol; (**5-100**) frações eluídas contendo APEX2, obtidas com tampão contendo gradientes de 5 a 100 mM de imidazol.

A fração de lavagem com 1 mM de imidazol (poço 2) apresenta múltiplas bandas, indicando a remoção seletiva de proteínas ainda associadas à resina, sem promover a eluição completa da APEX2rec. Nas frações eluídas com concentrações crescentes de imidazol (poços 3 a 9), observa-se um aumento na intensidade da banda correspondente à APEX2rec (33,53 kDa), com recuperação mais eficiente entre 10 e 15 mM (poços 4 e 5). Nesses mesmos poços, a presença de bandas adicionais sugere possível coeluição de contaminantes ou agregados proteicos. Por outro lado, as frações eluídas com 50 a 100 mM de imidazol apresentaram bandas tênues, possivelmente refletindo a depleção da proteína alvo nas etapas anteriores.

Com o objetivo de confirmar a identidade da proteína recombinante purificada e avaliar sua integridade estrutural, foi realizada uma análise por *Western blot*

utilizando anticorpo específico contra a cauda de histidinas (anti-His) (**Figura 25**). A presença de um sinal imunorreativo específico em ~33,53 kDa confirma a identidade da APEX2rec. No extrato total (ET, poço 2), é detectada uma banda de mesma mobilidade, compatível com a expressão da proteína em *E. coli*. Na fração não ligada (poço 3), também se observa correspondente à mesma massa molecular, sugerindo que parte da APEX2rec não foi retida pela matriz de afinidade, possivelmente devido a saturação da matriz.

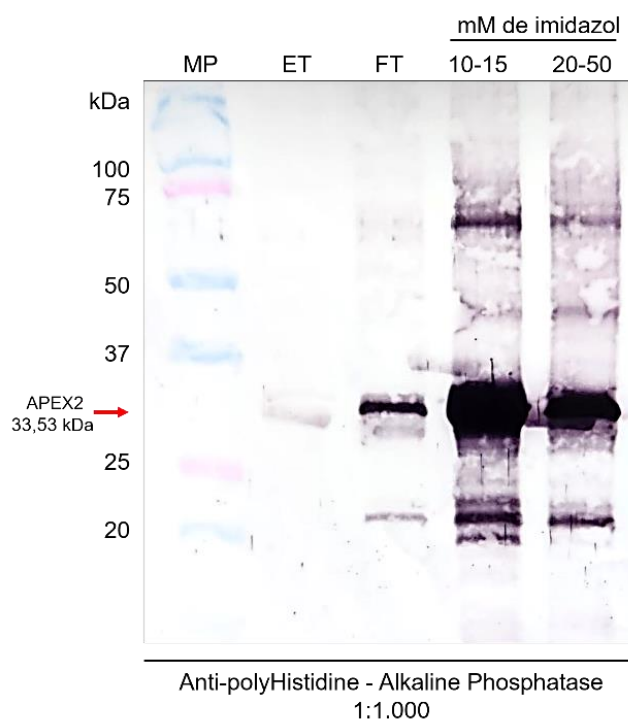


Figura 25. Análise da expressão e purificação da APEX2 recombinante por *Western blot* utilizando anticorpo anti-His. As frações analisadas incluem: (**MP**) marcador molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories); (**ET**) extrato total; (**FT**) fração não ligada ("*Flow-through*"), contendo a fração solúvel; **10-15** frações eluídas com 10–15 mM de imidazol; (**20-50**) frações eluídas com 20–50 mM de imidazol.

Nas frações eluídas com 10–15 mM (poço 4) e 20–50 mM de imidazol (poço 5), observa-se aumento da intensidade do sinal, indicando que essas concentrações favorecem a eluição mais eficiente da APEX2rec. Além da banda principal em ~33,53 kDa, nota-se um sinal adicional entre 50 e 75 kDa, o que sugere a possível formação de dímeros da APEX2rec, presumivelmente estáveis nas condições de eletroforese ou resultantes de interações com outra proteína. Essa interpretação é compatível com a ocorrência de interações intermoleculares mediadas pela cauda His-tag, que podem favorecer a oligomerização parcial da proteína recombinante.

Adicionalmente, sinais em torno de ~20 kDa também são observados nessas frações, o que pode indicar a presença de formas truncadas da APEX2rec ainda contendo o epítipo reconhecido pelo anticorpo anti-His.

5.10.1.2. Complementação *in vitro* com hemina e medição da concentração da holoproteína recombinante

Com o objetivo de avaliar a incorporação do cofator heme à APEX2rec, foi determinada a razão de absorvância A_{407}/A_{280} , também conhecida como índice de pureza ou Reinheitszahl. Esse parâmetro fornece uma estimativa da presença de grupos heme funcionalmente incorporados à proteína, uma vez que o anel porfirínico apresenta absorção característica em 407 nM. Na ausência de hemina, o índice registrado foi de 0,47, valor compatível com baixa ou nenhuma incorporação. Em contraste, após a complementação com hemina exógena, o índice aumentou para $2,05 \pm 10$, indicando uma incorporação eficiente do cofator ao centro ativo da proteína (Lad et al., 2002).

5.10.1.3. Cálculos cinéticos enzimáticos da enzima APEX2 recombinante

Com o objetivo de caracterizar cineticamente a atividade da peroxidase da APEX2rec, foi realizada uma análise enzimática utilizando guaiacol como substrato cromogênico, com concentrações variando entre 1 e 6 mM (incrementos de 1 mM). A partir dos dados experimentais, foi determinada uma V_{\max} de 0,0029633, K_m de 1,33 mM e um K_{cat} de 74 s^{-1} , resultando em uma eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) de aproximadamente $5,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Quando comparados aos dados cinéticos previamente descritos na literatura para APEX e APEX2 (Lam et al., 2014), observa-se uma discrepância: o grupo original descreveu para a APEX2rec um K_{cat} de 299 s^{-1} e K_m de 1,7 mM, com uma eficiência catalítica de $1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A atividade determinada neste trabalho da APEX2rec apresenta, portanto, eficiência cerca de 2,8 vezes inferior à reportada (**Error! Reference source not found.**).

Tabela 3. Parâmetros cinéticos da APEX2 recombinante

Peroxidase	K_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	K_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)
APEX*	230 ± 13	3,8 ± 0,6	6,1×10 ⁴
APEX2*	299 ± 13	1,7 ± 0,1	1,6×10 ⁵
APEX2rec [†]	74 ± 10	1,3 ± 0,8	5,7×10 ⁴

* Fonte: (Lam et. al., 2014)

[†] Atividade determinada neste trabalho

A divergência observada pode estar associada a fatores experimentais, principalmente à qualidade da síntese da proteína recombinante. A presença de formas parcialmente dobradas ou agregadas pode comprometer a atividade catalítica da APEX2rec, pois estruturas mal conformadas frequentemente tornam o sítio ativo inacessível, reduzindo a eficiência enzimática *in vitro*. Outro aspecto relevante é a ocorrência de truncamentos ou degradação da proteína, evidenciada por bandas de menor peso molecular no *Western blot*. A clivagem parcial pode gerar variantes que, embora mantenham a cauda His-tag, perdem domínios essenciais à atividade enzimática, contribuindo para a diminuição dos parâmetros cinéticos.

Em conjunto, os resultados indicam que a APEX2rec permanece funcional, podendo ser empregada em aplicações bioquímicas e celulares, embora com menor sensibilidade e velocidade de reação, demandando ajustes nas condições experimentais, como tempos de incubação, concentração de reagentes ou parâmetros de expressão.

5.10.1.1. Concentração ótima de biotina tiramida para a reação catalisada pela APEX2 recombinante

A análise por *Western blot* revelou aumento da intensidade do sinal na condição com 1 mM de biotina tiramida na presença de 1 mM de peróxido de hidrogênio, indicando que essa concentração promoveu maior eficiência na biotinação da BSA (1 mg/ml) sob as condições testadas. Esse resultado aponta 1 mM como a concentração ideal para a reação, por equilibrar a reatividade do substrato e a estabilidade do sistema, sendo, portanto, adotada nos experimentos subsequentes de biotinação (**Figura 26**).

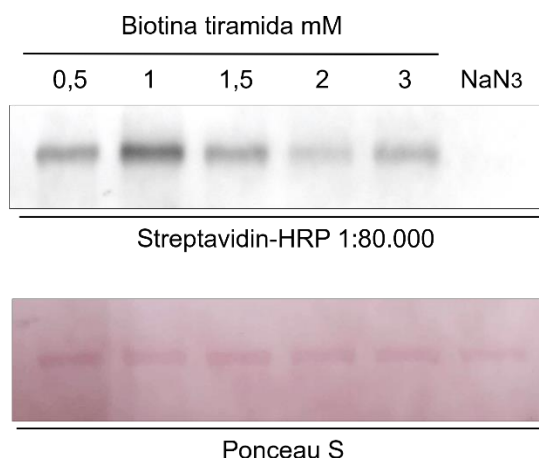


Figura 26. Avaliação da concentração ótima de biotina tiramida para a reação de biotinilação catalisada pela APEX2. A eficiência da biotinilação foi analisada por *Western blot*, utilizando estreptavidina-HRP para detecção da BSA marcada. Poços 1 a 5 correspondem às concentrações crescentes de biotina tiramida: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM, respectivamente; o poço 6 representa o controle negativo, tratado com azida de sódio (NaN₃) para inibição da atividade enzimática da APEX2.

5.10.2. Biotinilação das proteínas e lise da membrana de eritrócitos infectados

Após a obtenção das formas maduras de trofozoítos e esquizontes, realizou-se a biotinilação das proteínas de membrana dos eritrócitos infectados, utilizando os reagentes EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin, EZ-Link™ Maleimide-PEG2-Biotin e Biotina tiramida, em conjunto com a enzima APEX2, conforme as condições previamente otimizadas para cada protocolo. Em seguida, procedeu-se à lise seletiva das células com SLO, seguida por centrifugação diferencial, com o intuito de isolar a fração membrana contendo as proteínas biotiniladas, a qual foi posteriormente destinada à análise por espectrometria de massas.

A **Figura 27** apresenta a validação da biotinilação de proteínas de membrana pelas diferentes estratégias, as primeiras faixas, coloridas com vermelho Ponceau S, confirmam a integridade da transferência proteica. Observa-se que a maioria das amostras apresenta perfis proteicos similares, com bandas distribuídas ao longo de diferentes faixas de peso molecular, indicando que não houve perda significativa durante a transferência.

Na revelação com estreptavidina-HRP, foi possível identificar sinais específicos em diversas faixas de peso molecular, sugerindo uma biotinilação eficiente e seletiva de múltiplas proteínas. O padrão observado indica sucesso na marcação, com

enriquecimento evidente de determinadas bandas, o que pode refletir diferenças na acessibilidade dos reagentes biotinilantes às proteínas. Adicionalmente, a ausência de sinal no controle negativo assegura a especificidade da metodologia, descartando reatividade cruzada ou marcação inespecífica.

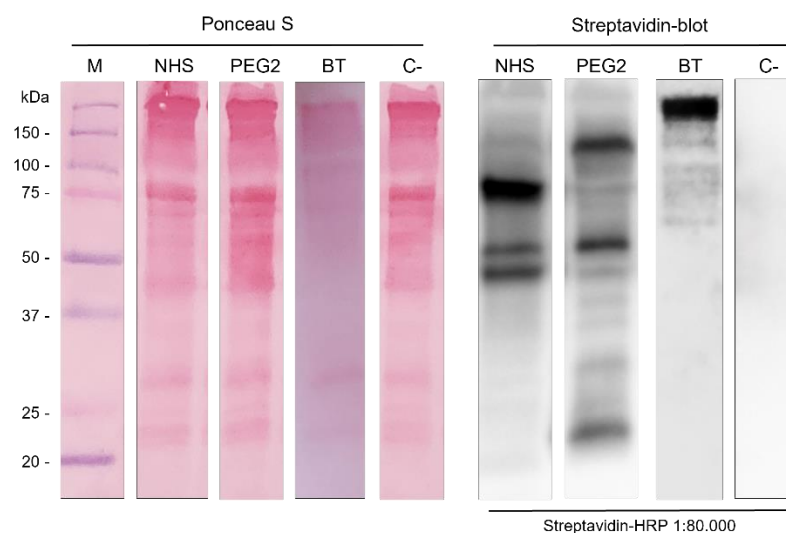


Figura 27. Western Blot de proteínas biotiniladas. Membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo primário Pierce™ High Sensitivity Streptavidin-HRP e revelada com substrato quimioluminescente (ECL™ Prime Western blotting detection reagent, GE Healthcare). **(M)** Marcador Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad Laboratories; **(NHS)** Biotinilação com EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin; **PEG2** Biotinilação com EZ-Link™ Maleimide-PEG2-Biotin; **(BT)** Biotina tiramida; **(C-)** controle negativo (Sem biotina).

5.10.2.1. Eluição das proteínas biotiniladas

A análise por *Western blot* com estreptavidina-HRP confirmou que as proteínas eluídas das esferas magnéticas de estreptavidina eram de fato biotiniladas e foram capturadas (**Figura 28**).

Embora a coloração geral da membrana por Ponceau S tenha sido praticamente nula —sinal típico quando a carga de proteína é baixa— a quantificação espectrofotométrica mostrou um rendimento total de cerca de 11–14 µg. Rendimentos nessa faixa são coerentes com protocolos de enriquecimento focados em subproteomas específicos, como proteínas de superfície, que constituem apenas uma fração do proteoma celular (Orioli & Vihinen, 2019; Wunderlich, 2022). Por exemplo, estima-se que proteínas de membrana representam até 25–30% das proteínas celulares, sendo que apenas uma fração dessas é acessível à biotinilação em condições experimentais específicas (Dobson et al., 2015). De fato, estudos utilizando

marcação por proximidade (como APEX) frequentemente relatam a identificação de algumas centenas de proteínas rotuladas, em contraste com os milhares esperados no proteoma global (Jaisinghani et al., 2024).

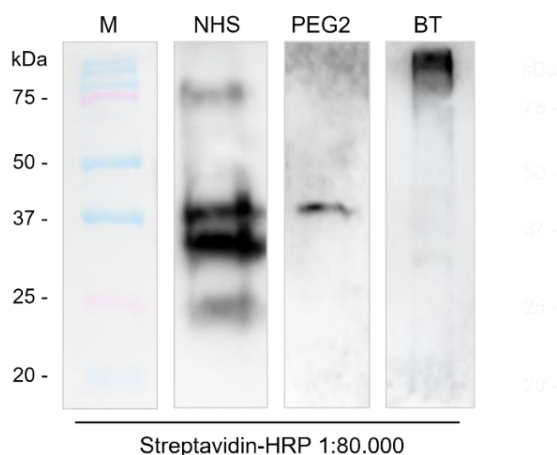


Figura 28. Western Blot de proteínas biotiniladas eluídas. Membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo primário Pierce™ High Sensitivity Streptavidin-HRP e revelada com substrato quimioluminescente (ECL™ Prime Western blotting detection reagent, GE Healthcare). **(M)** Marcador Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad Laboratories; **(NHS)** Biotinilação com EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin; **(PEG2)** Biotinilação com EZ-Link™ Maleimide-PEG2-Biotin; **(BT)** Biotina tiramida.

5.10.3. Visualização de proteínas biotiniladas por microscopia de fluorescência

Na imagem de imunofluorescência (**Figura 29**), o sinal verde é gerado pela estreptavidina conjugada ao Alexa Fluor 488, que se liga com alta afinidade à biotina incorporada nas proteínas de superfície. O DAPI, por sua vez, é um corante fluorescente de DNA que se liga ao grupo menor da dupla hélice e marca especificamente o material genético do *P. falciparum* (núcleo do parasito) na fase esquizonte.

A micrografia exibe eritrócitos infectados por *P. falciparum* no estágio de esquizonte, com um sinal verde proeminente ao redor do contorno celular e um sinal azul pontual no interior. A distribuição do sinal verde sugere que as proteínas da membrana do eritrócito infectado foram eficientemente marcadas pelos reagentes.

A uniformidade ou heterogeneidade da fluorescência verde ao longo da membrana pode refletir a densidade e acessibilidade dos resíduos-alvo. Por exemplo, o Sulfo-NHS-LC-Biotin tende a gerar um anel verde homogêneo quando várias proteínas de superfície possuem lisinas expostas, enquanto o Maleimide-PEG2-Biotin

pode gerar padrões diferentes, caso algumas cisteínas sejam mais escassas ou localizadas em domínios específicos da membrana.

Em ambas as condições, observa-se um contorno verde marcante, que coincide com a morfologia típica de um eritrócito circulante, indicando uma rotulagem eficaz da membrana plasmática. A intensidade geral do sinal da emissão fluorescente verde do fluoróforo Alexa Fluor 488 na membrana reflete a abundância de proteínas marcadas, como glicoforinas, α/β -espectrinas ou proteínas parasitárias exportadas, que contribuem para esse sinal.

Notavelmente, os núcleos do parasito (Azul) aparecem no interior sem sobreposição significativa de verde, indicando que os reagentes de biotinylation in vivo não penetraram no citosol das hemácias. Conclui-se, portanto, que a marcação foi restrita à superfície, evidenciando exclusivamente as proteínas superficiais do eritrócito infectado.

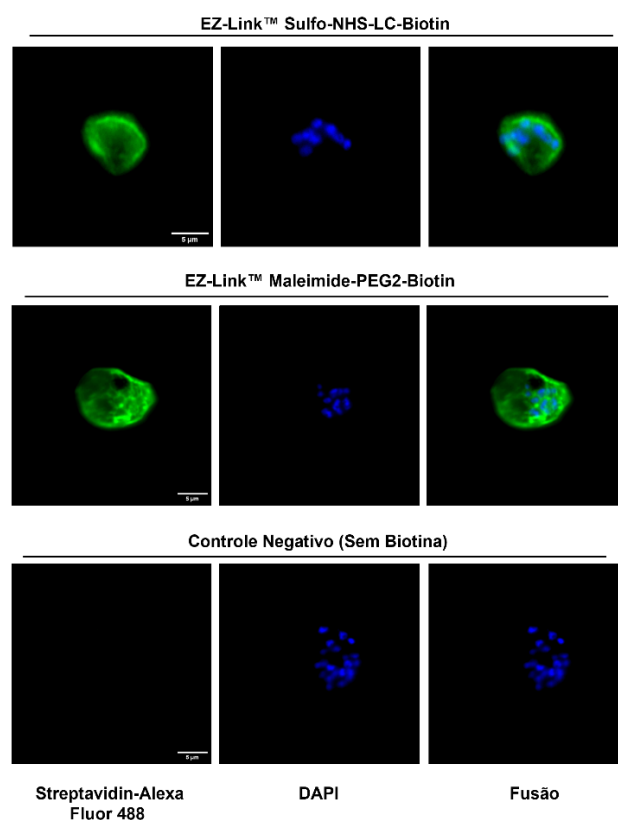


Figura 29. Imunofluorescência de eritrócitos infectados com *P. falciparum* (cepa 3D7) após biotinylation de proteínas de membrana com EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin e EZ-Link™ Maleimide-PEG2-Biotin. As células foram permeabilizadas após a biotinylation e incubadas com estreptavidina conjugada a Alexa Fluor 488 para detecção das proteínas biotinylationadas (verde). O núcleo dos parasitos foi marcado com DAPI (azul). O controle sem biotina mostrou resultado negativo, sem fluorescência verde, mas com sinal positivo para DAPI.

5.11. Análise por espectrometria de massas

A análise por espectrometria de massas das amostras biotinizadas pelas três metodologias e enriquecidas, não gerou resultados favoráveis devido à baixa recuperação de peptídeos biotinizados, comprometendo a confiabilidade dos dados obtidos nos três marcadores analisados. Presume-se que essa limitação decorra de uma eluição ineficiente das proteínas biotinizadas da matriz de estreptavidina, fenômeno já reportado na literatura (Hung et al., 2016). Dessa forma, recomenda-se a adoção de anticorpos anti-biotina como estratégia alternativa para a recuperação dessas proteínas (Udeshi et al., 2017), com o objetivo de aprimorar a reprodutibilidade e robustez dos dados em experimentações futuras.

VI. CONCLUSÃO

O presente estudo identificou proteínas de *P. falciparum* exportadas para a membrana plasmática de eritrócitos infectados durante o ciclo intraeritrocitário. Para alcançar esse objetivo, empregou-se uma metodologia de fracionamento subcelular composta por etapas sequenciais: sincronização do parasito com sorbitol, enriquecimento das formas maduras e lise seletiva da membrana eritrocitária. Essa estratégia permitiu isolar não apenas a membrana plasmática, caracteristicamente rica em colesterol, mas também compartimentos associados ao citoesqueleto, como as fendas de Maurer e a rede túbulo-vesicular, igualmente enriquecidos em domínios lipídicos relacionados ao tráfego de proteínas parasitárias. Como resultado, foi possível obter um perfil proteico abrangente, evidenciando componentes críticos envolvidos nos processos de exportação do parasito, bem como outros que são exportados dentro da célula hospedeira.

O uso de espectrometria de massas permitiu a identificação consistente de 622 proteínas, das quais 260 foram localizadas na fração membranar, confirmando a intensa remodelação celular provocada pelo parasito. A presença de componentes chave do citoesqueleto do eritrócito humano, e proteínas de virulência essenciais, como PfEMP1 e KAHRP, foram identificadas. Além disso, o estudo revelou um repertório diversificado de proteínas associadas à membrana, incluindo aquelas envolvidas no tráfego vesicular, na sinalização mediada por fosforilação e no complexo de egresso do *Plasmodium*. Famílias de antígeno de membrana pouco abundantes, como SURFIN, RIFIN e STEVOR não foram identificadas.

A integração dos dados proteômicos com banco de dados especializadas possibilitou a identificação de proteínas de *P. falciparum*, potencialmente localizadas na membrana plasmática do eritrócito infectado, sugerindo sua relevância funcional e seu potencial como alvos terapêuticos. Essa análise sistemática revelou a arquitetura funcional do "membranoma" na célula, que se organiza em clusters especializados para processos como remodelação do eritrócito, invasão, aquisição de nutrientes e citoadesão.

O estudo destacou candidatos promissores previamente identificados, como a proteína PIESP2, um antígeno de superfície com baixa diversidade alélica, e a aminopeptidase M1AAP, confirmada como um alvo terapêutico relevante. A identificação de vias metabólicas enriquecidas, particularmente as associadas à

maquinaria de tradução ribossomal e às chaperonas, sublinha o grande investimento do parasito no processamento de proteínas, indicando pontos vulneráveis para o desenvolvimento de novas terapias.

Do ponto de vista metodológico, foi possível produzir e caracterizar a enzima APEX2 recombinante funcional (APEX2rec), e determinar seus parâmetros cinéticos. A biotinylation *in vivo*, utilizando sondas químicas, foi completamente bem-sucedida e validada por meio de microscopia de fluorescência, mostrando uma marcação eficiente e restrita à superfície dos eritrócitos infectados. Contudo, a análise subsequente dos peptídeos biotinilados por espectrometria de massas foi limitada devido à baixa recuperação e à eluição ineficiente das proteínas marcadas da matriz de estreptavidina.

Para pesquisas futuras, é imperativo abordar essa limitação técnica, explorando métodos alternativos, como a utilização de anticorpos anti-biotina ou estreptavidina produzida por modificação química de lisinas e argininas, o que confere resistência à clivagem pela tripsina, a fim de melhorar a recuperação de proteínas ou peptídeos biotinilados e evitar contaminação por peptídeos da estreptavidina nas análises de espectrometria de massas (Rafiee et al., 2020; Udeshi et al., 2017).

Em suma, apesar das limitações encontradas, este trabalho oferece contribuições significativas para a biologia de *P. falciparum* e estabelece uma base sólida para futuras investigações, que poderão aprofundar nosso conhecimento sobre o parasito e suas interações com o hospedeiro.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Absalon, S., Blomqvist, K., Rudlaff, R. M., DeLano, T. J., Pollastri, M. P., & Dvorin, J. D. (2018). Calcium-Dependent Protein Kinase 5 Is Required for Release of Egress-Specific Organelles in *Plasmodium falciparum*. *MBio*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.00130-18>
- Acharya, D., Bavikatte, A. N., Ashok, V. V., Hegde, S. R., Macpherson, C. R., Scherf, A., & Vembar, S. S. (2025). Ectopic overexpression of *Plasmodium falciparum* DNA-/RNA-binding Alba proteins misregulates virulence gene homeostasis during asexual blood development. *Microbiology Spectrum*, 13(3), e0088524. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00885-24>
- Acharya, P., Chaubey, S., Grover, M., & Tatu, U. (2012). An Exported Heat Shock Protein 40 Associates with Pathogenesis-Related Knobs in *Plasmodium falciparum* Infected Erythrocytes. *PLoS ONE*, 7(9), e44605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044605>
- Adams, Y., Olsen, R. W., Bengtsson, A., Dalgaard, N., Zdioruk, M., Satpathi, S., Behera, P. K., Sahu, P. K., Lawler, S. E., Qvortrup, K., Wassmer, S. C., & Jensen, A. T. R. (2021). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 variants induce cell swelling and disrupt the blood–brain barrier in cerebral malaria. *Journal of Experimental Medicine*, 218(3). <https://doi.org/10.1084/jem.20201266>
- Ahmad, M., Manzella-Lapeira, J., Saggi, G., Ito, D., Brzostowski, J. A., & Desai, S. A. (2020). Live-Cell FRET Reveals that Malaria Nutrient Channel Proteins CLAG3 and RhopH2 Remain Associated throughout Their Tortuous Trafficking. *MBio*, 11(5), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01354-20>
- Alaganan, A., Singh, P., & Chitnis, C. E. (2017). Molecular mechanisms that mediate invasion and egress of malaria parasites from red blood cells. *Current Opinion in Hematology*, 24(3), 208–214. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000334>
- Alam, M. M., Solyakov, L., Bottrill, A. R., Flueck, C., Siddiqui, F. A., Singh, S., Mistry, S., Viskaduraki, M., Lee, K., Hopp, C. S., Chitnis, C. E., Doerig, C., Moon, R. W., Green, J. L., Holder, A. A., Baker, D. A., & Tobin, A. B. (2015). Phosphoproteomics reveals malaria parasite Protein Kinase G as a signalling hub regulating egress

- and invasion. *Nature Communications*, 6(1), 7285.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8285>
- Alexandra Rowe, J., Moulds, J. M., Newbold, C. I., & Miller, L. H. (1997). P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*, 388(6639), 292–295.
<https://doi.org/10.1038/40888>
- Alruwaili, M., Elderderly, A., Ejaz, H., Farhana, A., Atif, M., Almutary, H., & Mills, J. (2024). Genotyping and Characterizing Plasmodium falciparum to Reveal Genetic Diversity and Multiplicity of Infection by Merozoite Surface Proteins 1 and 2 (msp-1 and msp-2) and Glutamate-Rich Protein (glurp) Genes. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 9(11), 284. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9110284>
- Aly, A. S. I., Vaughan, A. M., & Kappe, S. H. I. (2009). Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 195–221.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073403>
- Aminake, M. N., Arndt, H.-D., & Pradel, G. (2012). The proteasome of malaria parasites: A multi-stage drug target for chemotherapeutic intervention? *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, 2, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2011.12.001>
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., & Ménard, R. (2006). Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, 12(2), 220–224. <https://doi.org/10.1038/NM1350>
- Anaguano, D., Dedkhad, W., Brooks, C. F., Cobb, D. W., & Muralidharan, V. (2023). Time-resolved proximity biotinylation implicates a porin protein in export of transmembrane malaria parasite effectors. *Journal of Cell Science*, 136(20).
<https://doi.org/10.1242/JCS.260506>
- Aniweh, Y., Gao, X., Hao, P., Meng, W., Lai, S. K., Gunalan, K., Chu, T. T., Sinha, A., Lescar, J., Chandramohanadas, R., Li, H. Y., Sze, S. K., & Preiser, P. R. (2017). P. falciparum RH5-Basigin interaction induces changes in the cytoskeleton of the host RBC. *Cellular Microbiology*, 19(9).
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28409866/>

- Ansorge, I., Benting, J., Bhakdi, S., & Lingelbach, K. (1996). Protein sorting in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. *The Biochemical Journal*, 315 (Pt 1(Pt 1)), 307–314. <https://doi.org/10.1042/bj3150307>
- Ansorge, I., Paprotka, K., Bhakdi, S., & Lingelbach, K. (1997). Permeabilization of the erythrocyte membrane with streptolysin O allows access to the vacuolar membrane of *Plasmodium falciparum* and a molecular analysis of membrane topology. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 84(2), 259–261. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02806-X](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02806-X)
- Asghari, A., Nourmohammadi, H., Majidiani, H., Shariatzadeh, S. A., Shams, M., & Montazeri, F. (2021). In silico analysis and prediction of immunogenic epitopes for pre-erythrocytic proteins of the deadly *Plasmodium falciparum*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 93. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2021.104985>
- Aurrecochea, C., Brestelli, J., Brunk, B. P., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J. C., Kraemer, E., Li, W., Miller, J. A., Nayak, V., Pennington, C., ... Wang, H. (2009). PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Research*, 37(Database), D539–D543. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn814>
- Azim-Zadeh, O., Hillebrecht, A., Linne, U., Marahiel, M. A., Klebe, G., Lingelbach, K., & Nyalwidhe, J. (2007). Use of Biotin Derivatives to Probe Conformational Changes in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21609–21617. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610921200>
- Azimzadeh, O., Sow, C., Gèze, M., Nyalwidhe, J., & Florent, I. (2010). *Plasmodium falciparum* PfA-M1 aminopeptidase is trafficked via the parasitophorous vacuole and marginally delivered to the food vacuole. *Malaria Journal*, 9(1), 189. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-189>
- Bachmann, A., Scholz, J. A. M., Janßen, M., Klinkert, M.-Q., Tannich, E., Bruchhaus, I., & Petter, M. (2015). A comparative study of the localization and membrane topology of members of the RIFIN, STEVOR and PfMC-2TM protein families in

- Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Malaria Journal*, 14(1), 274. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0784-2>
- Bahl, A. (2003). PlasmoDB: the Plasmodium genome resource. A database integrating experimental and computational data. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 212–215. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg081>
- Bakar, N. A., Klonis, N., Hanssen, E., Chan, C., & Tilley, L. (2010). Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum. *Journal of Cell Science*, 123(3), 441–450. <https://doi.org/10.1242/jcs.061499>
- Bakheet, T. M., & Doig, A. J. (2009). Properties and identification of human protein drug targets. *Bioinformatics*, 25(4), 451–457. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp002>
- Bannister, L. ., Hopkins, J. ., Fowler, R. ., Krishna, S., & Mitchell, G. . (2000). A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of Plasmodium falciparum Asexual Blood Stages. *Parasitology Today*, 16(10), 427–433. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01755-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01755-5)
- Bansal, A., Singh, S., More, K. R., Hans, D., Nangalia, K., Yogavel, M., Sharma, A., & Chitnis, C. E. (2013). Characterization of Plasmodium falciparum Calcium-dependent Protein Kinase 1 (PfCDPK1) and Its Role in Microneme Secretion during Erythrocyte Invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 288(3), 1590–1602. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.411934>
- Bargieri, D. Y., Andenmatten, N., Lagal, V., Thiberge, S., Whitelaw, J. A., Tardieux, I., Meissner, M., & Ménard, R. (2013). Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. *Nature Communications*, 4(1), 2552. <https://doi.org/10.1038/ncomms3552>
- Barua, P., Ahn, S. B., Mohamedali, A., & Liu, F. (2020). Improved sensitivity in cell surface protein detection by combining chemical labeling with mechanical lysis in a colorectal cancer cell model. *Biotechnology Letters*, 42(5), 683–695. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02824-1>
- Batinovic, S., McHugh, E., Chisholm, S. A., Matthews, K., Liu, B., Dumont, L., Charnaud, S. C., Schneider, M. P., Gilson, P. R., De Koning-Ward, T. F., Dixon,

- M. W. A. A., & Tilley, L. (2017). An exported protein-interacting complex involved in the trafficking of virulence determinants in Plasmodium-infected erythrocytes. *Nature Communications*, 8(1), 16044. <https://doi.org/10.1038/ncomms16044>
- Baum, J., Papenfuss, A. T., Baum, B., Speed, T. P., & Cowman, A. F. (2006). Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 621–628. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1465>
- Baumeister, S., Endermann, T., Charpian, S., Nyalwidhe, J., Duranton, C., Huber, S., Kirk, K., Lang, F., & Lingelbach, K. (2003). A biotin derivative blocks parasite induced novel permeation pathways in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 132(1), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.08.003>
- Baumeister, S., Winterberg, M., Duranton, C., Huber, S. M., Lang, F., Kirk, K., & Lingelbach, K. (2006). Evidence for the involvement of Plasmodium falciparum proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane. *Molecular Microbiology*, 60(2), 493–504. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2006.05112.X>
- Beier, J. C. (1998). MALARIA PARASITE DEVELOPMENT IN MOSQUITOES. *Annual Review of Entomology*, 43(1), 519–543. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.519>
- Bekić, V., & Kilian, N. (2023). Novel secretory organelles of parasite origin - at the center of host-parasite interaction. *BioEssays*, 45(9), e2200241. <https://doi.org/10.1002/bies.202200241>
- Bender, J., & Schmidt, C. (2019). Mass spectrometry of membrane protein complexes. *Biological Chemistry*, 400(7), 813–829. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0443>
- Bennett, K. L., Kussmann, M., Mikkelsen, M., Roepstorff, P., Björk, P., Godzwon, M., & Sörensen, P. (2000). Chemical cross-linking with thiol-cleavable reagents combined with differential mass spectrometric peptide mapping—A novel approach to assess intermolecular protein contacts. *Protein Science*, 9(8), 1503–1518. <https://doi.org/10.1110/PS.9.8.1503>,
- Bergman, L. W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T. M., Fox, S., Matuschewski, K., Nussenzweig, V., & Kappe, S. H. I. (2003). Myosin A tail

- domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of Plasmodium sporozoites. *Journal of Cell Science*, 116(1), 39–49. <https://doi.org/10.1242/jcs.00194>
- Bethke, L. L., Zilversmit, M., Nielsen, K., Daily, J., Volkman, S. K., Ndiaye, D., Lozovsky, E. R., Hartl, D. L., & Wirth, D. F. (2006). Duplication, gene conversion, and genetic diversity in the species-specific acyl-CoA synthetase gene family of Plasmodium falciparum. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 150(1), 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.06.004>
- Bisio, H., Chaabene, R. Ben, Sabitzki, R., Maco, B., Marq, J. B., Gilberger, T.-W., Spielmann, T., & Soldati-Favre, D. (2020). The ZIP Code of Vesicle Trafficking in Apicomplexa: SEC1/Munc18 and SNARE Proteins. *MBio*, 11(5), 1–21. <https://doi.org/10.1128/mBio.02092-20>
- Bittrich, S., Rose, Y., Segura, J., Lowe, R., Westbrook, J. D., Duarte, J. M., & Burley, S. K. (2022). RCSB Protein Data Bank: improved annotation, search and visualization of membrane protein structures archived in the PDB. *Bioinformatics*, 38(5), 1452–1454. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab813>
- Black, C. G., Proellocks, N. I., Kats, L. M., Cooke, B. M., Mohandas, N., & Coppel, R. L. (2008). In vivo studies support the role of trafficking and cytoskeletal-binding motifs in the interaction of MESA with the membrane skeleton of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160(2), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.04.001>
- Blatch, G. L. (2022). Plasmodium falciparum Molecular Chaperones: Guardians of the Malaria Parasite Proteome and Renovators of the Host Proteome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 921739. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.921739>
- Boddey, J. A., O'Neill, M. T., Lopaticki, S., Carvalho, T. G., Hodder, A. N., Nebl, T., Wawra, S., van West, P., Ebrahimzadeh, Z., Richard, D., Flemming, S., Spielmann, T., Przyborski, J., Babon, J. J., & Cowman, A. F. (2016). Export of malaria proteins requires co-translational processing of the PEXEL motif independent of phosphatidylinositol-3-phosphate binding. *Nature Communications*, 7(1), 10470. <https://doi.org/10.1038/ncomms10470>

- Bonam, S. R., Rénia, L., Tadepalli, G., Bayry, J., & Kumar, H. M. S. (2021). Plasmodium falciparum Malaria Vaccines and Vaccine Adjuvants. *Vaccines*, 9(10), 1072. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101072>
- Borre, M. B., Dziegiel, M., Høgh, B., Petersen, E., Rieneck, K., Riley, E., Meis, J. F., Aikawa, M., Nakamura, K., Harada, M., Wind, A., Jakobsen, P. H., Cowland, J., Jepsen, S., Axelsen, N. H., & Vuust, J. (1991). Primary structure and localization of a conserved immunogenic Plasmodium falciparum glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 49(1), 119–131. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90135-S](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90135-S)
- Bosch, J., Turley, S., Daly, T. M., Bogh, S. M., Villasmil, M. L., Roach, C., Zhou, N., Morrissey, J. M., Vaidya, A. B., Bergman, L. W., & Hol, W. G. J. (2006). Structure of the MTIP–MyoA complex, a key component of the malaria parasite invasion motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(13), 4852–4857. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510907103>
- Böttger, S., & Melzig, M. F. (2013). The influence of saponins on cell membrane cholesterol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(22), 7118–7124. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.008>
- Boucher, M. J., Ghosh, S., Zhang, L., Lal, A., Jang, S. W., Ju, A., Zhang, S., Wang, X., Ralph, S. A., Zou, J., Elias, J. E., & Yeh, E. (2018). Integrative proteomics and bioinformatic prediction enable a high-confidence apicoplast proteome in malaria parasites. *PLOS Biology*, 16(9), e2005895. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005895>
- Bounaadja, L., Schmitt, M., Albrecht, S., Mouray, E., Tarnus, C., & Florent, I. (2017). Selective inhibition of PfA-M1, over PfA-M17, by an amino-benzosuberone derivative blocks malaria parasites development in vitro and in vivo. *Malaria Journal*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12936-017-2032-4>
- Bour, T., Mahmoudi, N., Kapps, D., Thiberge, S., Bargieri, D., Ménard, R., & Frugier, M. (2016). Apicomplexa -specific tRip facilitates import of exogenous tRNAs into malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(17), 4717–4722. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600476113>

- Boyle, M. J., Langer, C., Chan, J.-A., Hodder, A. N., Coppel, R. L., Anders, R. F., & Beeson, J. G. (2014). Sequential Processing of Merozoite Surface Proteins during and after Erythrocyte Invasion by *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, *82*(3), 924–936. <https://doi.org/10.1128/IAI.00866-13>
- Boyle, M. J., Wilson, D. W., & Beeson, J. G. (2013). New approaches to studying *Plasmodium falciparum* merozoite invasion and insights into invasion biology. *International Journal for Parasitology*, *43*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.11.002>
- Bozdech, Z., Llinás, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J., & DeRisi, J. L. (2003). The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biology*, *1*(1), e5. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000005>
- 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 Biology*, *4*(2), R9. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-2-r9>
- Braschi, S., & Wilson, R. A. (2006). Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Molecular and Cellular Proteomics*, *5*(2), 347–356. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500287-MCP200>
- Brown, A. C., Moore, C. C., & Guler, J. L. (2020). Cholesterol-dependent enrichment of understudied erythrocytic stages of human *Plasmodium* parasites. *Scientific Reports*, *10*(1), 4591. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61392-6>
- Cameron Ritchie, E., Block, J., & Lee Nevin, R. (2013). Psychiatric side effects of mefloquine: applications to forensic psychiatry. *The Journal of the American Academy of Psychiatry and the Law*, *41*(2), 224–235. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23771936/>
- Cappellaro, C., Mrsa, V., & Tanner, W. (1998). New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *Journal of Bacteriology*, *180*(19), 5030–5037. <https://doi.org/10.1128/JB.180.19.5030-5037.1998>,
- Carneiro, R. G. (2019). *Estudo do exportoma de Plasmodium falciparum nos estágios eritrocitários tardios*. 142. <http://repositorio.unb.br/handle/10482/36736>

- Carucci, D. J., Yates, J. R., & Florens, L. (2002). Exploring the proteome of Plasmodium. *International Journal for Parasitology*, 32(13), 1539–1542. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00181-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00181-9)
- Carvalho, P. A., Diez-Silva, M., Chen, H., Dao, M., & Suresh, S. (2013). Cytoadherence of erythrocytes invaded by Plasmodium falciparum: Quantitative contact-probing of a human malaria receptor. *Acta Biomaterialia*, 9(5), 6349–6359. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.019>
- Casanova, M., Lopez-Ribot, J. L., Martinez, J. P., & Sentandreu, R. (1992). Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of Candida albicans by labelling with biotin: Comparison with other techniques. *Infection and Immunity*, 60(11), 4898–4906. <https://doi.org/10.1128/IAI.60.11.4898-4906.1992>,
- Castellano, C. M., Lacroix, L., Mathis, E., Prorok, P., Hennion, M., Lopez-Rubio, J. J., Méchali, M., & Gomes, A. R. (2024). The genetic landscape of origins of replication in P. falciparum. *Nucleic Acids Research*, 52(2), 660–676. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD1103>,
- Chahine, Z., & Le Roch, K. G. (2022). Decrypting the complexity of the human malaria parasite biology through systems biology approaches. *Frontiers in Systems Biology*, 2, 940321. <https://doi.org/10.3389/fsysb.2022.940321>
- Chan, J.-A., Fowkes, F. J. I., & Beeson, J. G. (2014). Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(19), 3633–3657. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1614-3>
- Charneau, S., de Oliveira, L. S., Zenonos, Z., Hopp, C. S., Bastos, I. M. D., Loew, D., Lombard, B., Pandolfo Silveira, A., de Carvalho Nardeli Basílio Lobo, G., Bao, S. N., Grellier, P., & Rayner, J. C. (2024). APEX2-based proximity proteomic analysis identifies candidate interactors for Plasmodium falciparum knob-associated histidine-rich protein in infected erythrocytes. *Scientific Reports*, 14(1), 11242. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61295-w>
- Charneau, S., Dourado Bastos, I. M., Mouray, E., Ribeiro, B. M., Santana, J. M., Grellier, P., & Florent, I. (2007). Characterization of PfDYN2, a dynamin-like protein of Plasmodium falciparum expressed in schizonts. *Microbes and Infection*,

- 9(7), 797–805. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.020>
- Chen, L., Xu, Y., Wong, W., Thompson, J. K., Healer, J., Goddard-Borger, E. D., Lawrence, M. C., & Cowman, A. F. (2017). Structural basis for inhibition of erythrocyte invasion by antibodies to *Plasmodium falciparum* protein CyRPA. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.21347>
- Chen, W. U., Yu, L., Strittmatter, E. F., Thrall, B. D., Camp, D. G., & Smith, R. D. (2003). Detection of in situ labeled cell surface proteins by mass spectrometry: application to the membrane subproteome of human mammary epithelial cells. *Proteomics*, 3(8), 1647–1651. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300468>
- Chew, O., Whelan, J., & Millar, A. H. (2003). Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46869–46877. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307525200>
- Chishti, A. H., Maalouf, G. J., Marfatia, S., Palek, J., Wang, W., Fisher, D., & Liu, S. C. (1994). Phosphorylation of Protein 4.1 in *Plasmodium falciparum*-Infected Human Red Blood Cells. *Blood*, 83(11), 3339–3345. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V83.11.3339.3339>
- Chitnis, C. E., & Blackman, M. J. (2000). Host cell invasion by malaria parasites. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 16(10), 411–415. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(00\)01756-7](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(00)01756-7)
- Cohn, J. V., Alkhalil, A., Wagner, M. A., Rajapandi, T., & Desai, S. A. (2003). Extracellular lysines on the plasmodial surface anion channel involved in Na⁺ exclusion. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 132(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.08.001>
- Collins, C. R., Hackett, F., Atid, J., Tan, M. S. Y., & Blackman, M. J. (2017). The *Plasmodium falciparum* pseudoprotease SERA5 regulates the kinetics and efficiency of malaria parasite egress from host erythrocytes. *PLoS Pathogens*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1006453>
- Conboy, J., Kan, Y. W., Shohet, S. B., & Mohandas, N. (1986). Molecular cloning of protein 4.1, a major structural element of the human erythrocyte membrane skeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

- of America*, 83(24), 9512–9516. <https://doi.org/10.1073/PNAS.83.24.9512>,
- Cooke, B. M., Buckingham, D. W., Glenister, F. K., Fernandez, K. M., Bannister, L. H., Marti, M., Mohandas, N., & Coppel, R. L. (2006). A Maurer's cleft-associated protein is essential for expression of the major malaria virulence antigen on the surface of infected red blood cells. *Journal of Cell Biology*, 172(6), 899–908. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16520384/>
- Coppens, I., & Romano, J. D. (2020). Sitting in the driver's seat: Manipulation of mammalian cell Rab GTPase functions by apicomplexan parasites. *Biology of the Cell*, 112(7), 187–195. <https://doi.org/10.1111/BOC.201900107>,
- Counihan, N. A., Chisholm, S. A., Bullen, H. E., Srivastava, A., Sanders, P. R., Jonsdottir, T. K., Weiss, G. E., Ghosh, S., Crabb, B. S., Creek, D. J., Gilson, P. R., & de Koning-Ward, T. F. (2017). Plasmodium falciparum parasites deploy RhopH2 into the host erythrocyte to obtain nutrients, grow and replicate. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.23217>
- Counihan, N. A., Kalanon, M., Coppel, R. L., & De Koning-Ward, T. F. (2013). Plasmodium rhoptry proteins: Why order is important. *Trends in Parasitology*, 29(5), 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.03.003>
- Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124(4), 755–766. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.006>
- Malaria: Biology and Disease, 167 Cell 610 (2016). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27768886/>
- Cowman, A. F., Tonkin, C. J., Tham, W. H., & Duraisingh, M. T. (2017). The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host and Microbe*, 22(2), 232–245. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.003>
- Crabb, B. S., Cooke, B. M., Reeder, J. C., Waller, R. F., Caruana, S. R., Davern, K. M., Wickham, M. E., Brown, G. V., Coppel, R. L., & Cowman, A. F. (1997). Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell*, 89(2), 287–296. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80207-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80207-X)
- Crabb, B. S., de Koning-Ward, T. F., & Gilson, P. R. (2010). Protein export in

- Plasmodium parasites: From the endoplasmic reticulum to the vacuolar export machine. *International Journal for Parasitology*, 40(5), 509–513. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2010.02.002>
- Craig, A. (2001). Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(2), 129–143. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00275-4](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00275-4)
- Creasey, A., Mendis, K., Carlton, J., Williamson, D., Wilson, I., & Carter, R. (1994). Maternal inheritance of extrachromosomal DNA in malaria parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 65(1), 95–98. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90118-X)
- Crompton, P. D., Kayala, M. A., Traore, B., Kayentao, K., Ongoiba, A., Weiss, G. E., Molina, D. M., Burk, C. R., Waisberg, M., Jasinskas, A., Tan, X., Doumbo, S., Doumtabe, D., Kone, Y., Narum, D. L., Liang, X., Doumbo, O. K., Miller, L. H., Doolan, D. L., ... Pierce, S. K. (2010). A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), 6958–6963. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1001323107>
- Crompton, P. D., Moebius, J., Portugal, S., Waisberg, M., Hart, G., Garver, L. S., Miller, L. H., Barillas, C., & Pierce, S. K. (2014). Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annual Review of Immunology*, 32, 157–187. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032713-120220>
- Dalton, D. A., Diaz Del Castillo, L., Kahn, M. L., Joyner, S. L., & Chatfield, J. M. (1996). Heterologous expression and characterization of soybean cytosolic ascorbate peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 328(1), 1–8. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0135>
- De Koning-Ward, T. F., Gilson, P. R., Boddey, J. A., Rug, M., Smith, B. J., Papenfuss, A. T., Sanders, P. R., Lundie, R. J., Maier, A. G., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2009). A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature*, 459(7249), 945–949. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19536257/>

- Deligianni, E., Morgan, R. N., Bertuccini, L., Wirth, C. C., Silmon de Monerri, N. C., Spanos, L., Blackman, M. J., Louis, C., Pradel, G., & Siden-Kiamos, I. (2013). A perforin-like protein mediates disruption of the erythrocyte membrane during egress of *Plasmodium berghei* male gametocytes. *Cellular Microbiology*, *15*(8), 1438–1455. <https://doi.org/10.1111/CMI.12131>,
- Dijkman, P. M., Marzluf, T., Zhang, Y., Chang, S.-Y. S., Helm, D., Lanzer, M., Bujard, H., & Kudryashev, M. (2021). Structure of the merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*. *Science Advances*, *7*(23), D517–D522. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg0465>
- Dobson, L., Reményi, I., & Tusnády, G. E. (2015). The human transmembrane proteome. *Biology Direct*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/S13062-015-0061-X>,
- Duffy, P. E. (2022). Current approaches to malaria vaccines. *Current Opinion in Microbiology*, *70*, 102227. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102227>
- Duncan, J. L., & Schlegel, R. (1975). Effect of streptolysin o on erythrocyte membranes, liposomes, and lipid dispersions: A protein-cholesterol interaction. *Journal of Cell Biology*, *67*(1), 160–173. <https://doi.org/10.1083/JCB.67.1.160>,
- Dutta, T., Singh, H., Edkins, A. L., & Blatch, G. L. (2022). Hsp90 and Associated Co-Chaperones of the Malaria Parasite. *Biomolecules*, *12*(8). <https://doi.org/10.3390/BIOM12081018>,
- Earland, D., Buchwald, A. G., Sixpence, A., Chimanya, M., Damson, M., Seydel, K. B., Mathanga, D. P., Taylor, T. E., & Laufer, M. K. (2019). Impact of Multiplicity of *Plasmodium falciparum* Infection on Clinical Disease in Malawi. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *101*(2), 412–415. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.19-0093>
- Egan, T. J. (2008). Haemozoin formation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *157*(2), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.005>
- Elia, G. (2008). Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. *Proteomics*, *8*(19), 4012–4024. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800097>
- Elsworth, B., Matthews, K., Nie, C. Q., Kalanon, M., Charnaud, S. C., Sanders, P. R., Chisholm, S. A., Counihan, N. A., Shaw, P. J., Pino, P., Chan, J. A., Azevedo, M.

- F., Rogerson, S. J., Beeson, J. G., Crabb, B. S., Gilson, P. R., & De Koning-Ward, T. F. (2014). PTEX is an essential nexus for protein export in malaria parasites. *Nature*, *511*(7511), 587–591. <https://doi.org/10.1038/NATURE13555>
- Elsworth, B., Sanders, P. R., Nebl, T., Batinovic, S., Kalanon, M., Nie, C. Q., Charnaud, S. C., Bullen, H. E., de Koning Ward, T. F., Tilley, L., Crabb, B. S., & Gilson, P. R. (2016). Proteomic analysis reveals novel proteins associated with the Plasmodium protein exporter PTEX and a loss of complex stability upon truncation of the core PTEX component, PTEX150. *PLoS ONE*, *11*(11), 1551–1569. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27019089/>
- Fanello, C., Santolamazza, F., & Della Torre, A. (2002). Simultaneous identification of species and molecular forms of the Anopheles gambiae complex by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology*, *16*(4), 461–464. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2915.2002.00393.X>
- Farrell, B., Alam, N., Hart, M. N., Jamwal, A., Ragotte, R. J., Walters-Morgan, H., Draper, S. J., Knuepfer, E., & Higgins, M. K. (2024). The PfRCR complex bridges malaria parasite and erythrocyte during invasion. *Nature*, *625*(7995), 578–584. <https://doi.org/10.1038/S41586-023-06856-1>,
- Fierro, M. A., Muheljic, A., Sha, J., Wohlschlegel, J., & Beck, J. R. (2024). PEXEL is a proteolytic maturation site for both exported and non-exported Plasmodium proteins. *MSphere*, *9*(2). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00393-23>,
- Flick, K., & Chen, Q. (2004). var genes, PfEMP1 and the human host. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *134*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.09.010>
- Flipo, M., Beghyn, T., Leroux, V., Florent, I., Deprez, B. P., & Deprez-Poulain, R. F. (2007). Novel selective inhibitors of the zinc plasmodial aminopeptidase PfA-M1 as potential antimalarial agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, *50*(6), 1322–1334. <https://doi.org/10.1021/JM061169B>
- Florens, L., Liu, X., Wang, Y., Yang, S., Schwartz, O., Peglar, M., Carucci, D. J., Yates, J. R., & Wu, Y. (2004). Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *135*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2003.12.007>

- Florens, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., Anthony, R. M., Grainger, M., Haynes, J. D., Moch, J. K., Muster, N., Sacci, J. B., Tabb, D. L., Witney, A. A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M. J., Holder, A. A., Sinden, R. E., Yates, J. R., & Carucci, D. J. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, *419*(6906), 520–526. <https://doi.org/10.1038/nature01107>
- Foster, A. J., Bird, R. A., & Smith, S. N. (2007). Biotinylation and characterization of *Cryptococcus neoformans* cell surface proteins. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(2), 390–399. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2006.03259.X>,
- Foth, B. J., Ralph, S. A., Tonkin, C. J., Struck, N. S., Fraunholz, M., Roos, D. S., Cowman, A. F., & McFadden, G. I. (2003). Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science (New York, N.Y.)*, *299*(5607), 705–708. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1078599>
- Frederich, M., Dogne, J.-M., Angenot, L., & Mol, P. (2002). New trends in anti-malarial agents. *Current Medicinal Chemistry*, *9*(15), 1435–1456. <https://doi.org/10.2174/0929867023369691>
- Gabriela, M., Barnes, C. B. G., Leong, D., Sleeb, B. E., Schneider, M. P., Littler, D. R., Crabb, B. S., de Koning-Ward, T. F., & Gilson, P. R. (2024). Sequence elements within the PEXEL motif and its downstream region modulate PTEX-dependent protein export in *Plasmodium falciparum*. *Traffic*, *25*(1). <https://doi.org/10.1111/TRA.12922>,
- Gabriela, M., Matthews, K. M., Boshoven, C., Kouskousis, B., Jonsdottir, T. K., Bullen, H. E., Modak, J., Steer, D. L., Sleeb, B. E., Crabb, B. S., Koning-Ward, T. F. de, Gilson, P. R., de Koning-Ward, T. F., & Gilson, P. R. (2022). A revised mechanism for how *Plasmodium falciparum* recruits and exports proteins into its erythrocytic host cell. *PLOS Pathogens*, *18*(2), e1009977. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009977>
- 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., ... Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, *419*(6906), 498–511. <https://doi.org/10.1038/nature01097>

- Garg, S., Shivappagowdar, A., Hada, R. S., Ayana, R., Bathula, C., Sen, S., Kalia, I., Pati, S., Singh, A. P., & Singh, S. (2020). Plasmodium Perforin-Like Protein Pores on the Host Cell Membrane Contribute in Its Multistage Growth and Erythrocyte Senescence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00121>,
- Garten, M., Nasamu, A. S., Niles, J. C., Zimmerberg, J., Goldberg, D. E., & Beck, J. R. (2018). EXP2 is a nutrient-permeable channel in the vacuolar membrane of Plasmodium and is essential for protein export via PTEX. *Nature Microbiology*, 3(10), 1090–1098. <https://doi.org/10.1038/S41564-018-0222-7>,
- Gen, M., Ahoudi, A., Ali, M., Almagro-Garcia, J., Amambua-Ngwa, A., Amaratunga, C., Amato, R., Amenga-Etego, L., Andagalu, B., Anderson, T. J. C., Andrianaranjaka, V., Apinjoh, T., Ariani, C., Ashley, E. A., Auburn, S., Awandare, G. A., Ba, H., Baraka, V., Barry, A. E., ... Ye, H. (2021). An open dataset of Plasmodium falciparum genome variation in 7,000 worldwide samples. *Wellcome Open Research*, 6, 1–31. <https://doi.org/10.12688/WELLCOMEOPENRES.16168.2>
- Geoghegan, N. D., Evelyn, C., Whitehead, L. W., Pasternak, M., McDonald, P., Triglia, T., Marapana, D. S., Kempe, D., Thompson, J. K., Mlodzianoski, M. J., Healer, J., Biro, M., Cowman, A. F., & Rogers, K. L. (2021). 4D analysis of malaria parasite invasion offers insights into erythrocyte membrane remodeling and parasitophorous vacuole formation. *Nature Communications*, 12(1), 1–16. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34131147/>
- Gnangnon, B., Fréville, A., Cailliau, K., Leroy, C., De Witte, C., Tulasne, D., Martoriarti, A., Jung, V., Guerrero, I. C., Marion, S., Khalife, J., & Pierrot, C. (2019). Plasmodium pseudo-Tyrosine Kinase-like binds PP1 and SERA5 and is exported to host erythrocytes. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-44542-3>,
- Goel, S., Palmkvist, M., Moll, K., Joannin, N., Lara, P., R Akhouri, R., Moradi, N., Öjemalm, K., Westman, M., Angeletti, D., Kjellin, H., Lehtiö, J., Blixt, O., Idestrom, L., Gahmberg, C. G., Storry, J. R., Hult, A. K., Olsson, M. L., Von Heijne, G., ... Wahlgren, M. (2015). RIFINs are adhesins implicated in severe Plasmodium falciparum malaria. *Nature Medicine*, 21(4), 314–321.

<https://doi.org/10.1038/NM.3812>

- Goel, S., Valiyaveetil, M., Achur, R. N., Goyal, A., Mattei, D., Salanti, A., Trenholme, K. R., Gardiner, D. L., & Gowda, D. C. (2010). Dual stage synthesis and crucial role of cytoadherence-linked asexual gene 9 in the surface expression of malaria parasite var proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(38), 16643–16648. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002568107>
- Goldberg, D. E., Slater, A. F. G., Beavis, R., Chait, B., Cerami, A., & Henderson, G. B. (1991). Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: A catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease. *Journal of Experimental Medicine*, *173*(4), 961–969. <https://doi.org/10.1084/JEM.173.4.961>,
- Golenser, J., Waknine, J. H., Krugliak, M., Hunt, N. H., & Grau, G. E. (2006). Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *International Journal for Parasitology*, *36*(14), 1427–1441. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.07.011>
- Graewe, S., Stanway, R. R., Rennenberg, A., & Heussler, V. T. (2012). Chronicle of a death foretold: *Plasmodium* liver stage parasites decide on the fate of the host cell. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(1), 111–130. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00297.X>
- Green, J. L., Martin, S. R., Fielden, J., Ksagoni, A., Grainger, M., Yim Lim, B. Y. S., Molloy, J. E., & Holder, A. A. (2006). The MTIP-myosin A complex in blood stage malaria parasites. *Journal of Molecular Biology*, *355*(5), 933–941. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.027>
- Green, N. M. (1975). Avidin. *Advances in Protein Chemistry*, *29*(C), 85–133. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60411-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60411-8),
- Grüner, A. C., Brahimi, K., Eling, W., Konings, R., Meis, J., Aikawa, M., Daubersies, P., Guérin-Marchand, C., Mellouk, S., Snounou, G., & Druilhe, P. (2001). The *Plasmodium falciparum* knob-associated PfEMP3 antigen is also expressed at pre-erythrocytic stages and induces antibodies which inhibit sporozoite invasion. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *112*(2), 253–261. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00373-X](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00373-X),

- Guerra, F., & Winzeler, E. A. (2022). New targets for antimalarial drug discovery. *Current Opinion in Microbiology*, 70, 102220. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2022.102220>
- Guilbride, D. L., Guilbride, P. D. L., & Gawlinski, P. (2012). Malaria's deadly secret: a skin stage. *Trends in Parasitology*, 28(4), 142–150. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2012.01.002>
- Gupta, A., Balabaskaran-Nina, P., Nguitragool, W., Saggi, G. S., Schureck, M. A., & Desai, S. A. (2018). CLAG3 self-associates in malaria parasites and quantitatively determines nutrient uptake channels at the host Membrane. *MBio*, 9(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02293-17>,
- Han, S., Udeshi, N. D., Deerinck, T. J., Svinkina, T., Ellisman, M. H., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2017). Proximity Biotinylation as a Method for Mapping Proteins Associated with mtDNA in Living Cells. *Cell Chemical Biology*, 24(3), 404–414. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.02.002>
- Han, Y., Branon, T. C., Martell, J. D., Boassa, D., Shechner, D., Ellisman, M. H., & Ting, A. (2019). Directed Evolution of Split APEX2 Peroxidase. *ACS Chemical Biology*, 14(4), 619–635. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00919>
- Harbach, R. E. (2013). *Anopheles classification*. Mosquito Taxonomy Inventory. <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/simpletaxonomy/term/6047>
- Hasan, M. M., Polino, A. J., Mukherjee, S., Vaupel, B., & Goldberg, D. E. (2023). The mature N-termini of Plasmodium effector proteins confer specificity of export. *MBio*, 14(5), e0121523. <https://doi.org/10.1128/mbio.01215-23>
- Hayward, R., Saliba, K. J., & Kirk, K. (2006). The pH of the digestive vacuole of Plasmodium falciparum is not associated with chloroquine resistance. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 6), 1016–1025. <https://doi.org/10.1242/JCS.02795>
- He, L., Qiu, Y., Pang, G., Li, S., Wang, J., Feng, Y., Chen, L., Zhu, L., Liu, Y., Cui, L., Cao, Y., & Zhu, X. (2023). Plasmodium falciparum GAP40 Plays an Essential Role in Merozoite Invasion and Gametocytogenesis. *Microbiology Spectrum*, 11(3). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01434-23>,
- Healer, J., Crawford, S., Ralph, S., McFadden, G., & Cowman, A. F. (2002).

- Independent Translocation of Two Micronemal Proteins in Developing Plasmodium falciparum Merozoites. *Infection and Immunity*, 70(10), 5751. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5751-5758.2002>
- Hekkelman, M. L., de Vries, I., Joosten, R. P., & Perrakis, A. (2023). AlphaFill: enriching AlphaFold models with ligands and cofactors. *Nature Methods*, 20(2), 205–213. <https://doi.org/10.1038/S41592-022-01685-Y>
- Helms, G., Dasanna, A. K., Schwarz, U. S., & Lanzer, M. (2016). Modeling cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and leukocytes—common principles and distinctive features. *FEBS Letters*, 590(13), 1955–1971. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12142>
- Hiller, N. L., Bhattacharjee, S., Van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estraño, C., & Haldar, K. (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *306(5703)*, 1934–1937. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15591203/>
- Hopkins, J., Fowler, R., Krishna, S., Wilson, I., Mitchell, G., & Bannister, L. (1999). The plastid in Plasmodium falciparum asexual blood stages: a three-dimensional ultrastructural analysis. *Protist*, 150(3), 283–295. [https://doi.org/10.1016/S1434-4610\(99\)70030-1](https://doi.org/10.1016/S1434-4610(99)70030-1)
- Huang, M. Sen, Lin, W. C., Chang, J. H., Cheng, C. H., Wang, H. Y., & Mou, K. Y. (2019). The cysteine-free single mutant C32S of APEX2 is a highly expressed and active fusion tag for proximity labeling applications. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 28(9), 1703. <https://doi.org/10.1002/PRO.3685>
- Hung, V., Udeshi, N. D., Lam, S. S., Loh, K. H., Cox, K. J., Pedram, K., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2016). Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nature Protocols*, 11(3), 456–475. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.018>
- Iriko, H., Ishino, T., Otsuki, H., Ito, D., Tachibana, M., Torii, M., & Tsuboi, T. (2018). Plasmodium falciparum Exported Protein 1 is localized to dense granules in merozoites. *Parasitology International*, 67(5), 637–639. <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2018.06.001>
- Ishtiaq, F., Swain, S., & Kumar, S. S. (2021). Anopheles stephensi (Asian Malaria

- Mosquito). *Trends in Parasitology*, 37(6), 571–572.
<https://doi.org/10.1016/J.PT.2021.03.009>
- Ito, D., Chen, J. H., Takashima, E., Hasegawa, T., Otsuki, H., Takeo, S., Thongkukiatkul, A., Han, E. T., & Tsuboi, T. (2021). Identification of a Novel RAMA/RON3 Rhoptry Protein Complex in *Plasmodium falciparum* Merozoites. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10.
<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.605367>,
- Ito, D., Kondo, Y., Takashima, E., Iriko, H., Thongkukiatkul, A., Torii, M., & Otsuki, H. (2023). Roles of the RON3 C-terminal fragment in erythrocyte invasion and blood-stage parasite proliferation in *Plasmodium falciparum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2023.1197126/PDF>
- Ito, D., Schureck, M. A., & Desai, S. A. (2017). An essential dual-function complex mediates erythrocyte invasion and channel-mediated nutrient uptake in malaria parasites. *ELife*, 6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28221136/>
- Jackson, K. E., Spielmann, T., Hanssen, E., Adisa, A., Separovic, F., Dixon, M. W. A., Trenholme, K. R., Hawthorne, P. L., Gardiner, D. L., Gilberger, T., & Tilley, L. (2007). Selective permeabilization of the host cell membrane of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells with streptolysin O and equinatoxin II. *Biochemical Journal*, 403(1), 167–175. <https://doi.org/10.1042/BJ20061725>
- Jaisinghani, N., Previti, M. L., Andrade, J., Askenazi, M., Ueberheide, B., & Seeliger, J. C. (2024). Proteomics from compartment-specific APEX2 labeling in *Mycobacterium tuberculosis* reveals Type VII secretion substrates in the cell wall. *Cell Chemical Biology*, 31(3), 523-533.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.10.013>
- Jaskiewicz, E., Jodłowska, M., Kaczmarek, R., & Zerka, A. (2019). Erythrocyte glycoporphins as receptors for *Plasmodium* merozoites. *Parasites and Vectors*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3575-8>
- Jassal, B., Matthews, L., Viteri, G., Gong, C., Lorente, P., Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Cook, J., Gillespie, M., Haw, R., Loney, F., May, B., Milacic, M., Rothfels, K., Sevilla, C., Shamovsky, V., Shorser, S., Varusai, T., Weiser, J., ... D'Eustachio, P. (2020). The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Research*,

48(D1), D498–D503. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ1031>

- Jonsdottir, T. K., Counihan, N. A., Modak, J. K., Kouskousis, B., Sanders, P. R., Gabriela, M., Bullen, H. E., Crabb, B. S., de Koning-Ward, T. F., & Gilson, P. R. (2021). Characterisation of complexes formed by parasite proteins exported into the host cell compartment of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Cellular Microbiology*, 23(8). <https://doi.org/10.1111/CMI.13332>
- Jonsdottir, T. K., Gabriela, M., Crabb, B. S., F de Koning-Ward, T., & Gilson, P. R. (2021). Defining the Essential Exportome of the Malaria Parasite. *Trends in Parasitology*, 37(7), 664–675. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.009>
- Kakhniashvili, D. G., Bulla, L. A., & Goodman, S. R. (2004). The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 3(5), 501–509. <https://doi.org/10.1074/MCP.M300132-MCP200>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.27>
- Kanoi, B. N., Nagaoka, H., White, M. T., Morita, M., Palacpac, N. M. Q., Ntege, E. H., Balikagala, B., Yeka, A., Egwang, T. G., Horii, T., Tsuboi, T., & Takashima, E. (2020). Global Repertoire of Human Antibodies Against *Plasmodium falciparum* RIFINs, SURFINs, and STEVORs in a Malaria Exposed Population. *Frontiers in Immunology*, 11, 525640. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00893/BIBTEX>
- Karbanowicz, T. P., Lew-Tabor, A., & Rodriguez Valle, M. (2017). Purification of Biotinylated Cell Surface Proteins from *Rhipicephalus microplus* Epithelial Gut Cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 125. <https://doi.org/10.3791/55747>,
- Kariuki, M. M., Li, X., Yamodo, I., Chishti, A. H., & Oh, S. S. (2005). Two *Plasmodium falciparum* merozoite proteins binding to erythrocyte band 3 form a direct complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(4), 1690–1695. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.154>
- Kaslow, D. C., & Biernaux, S. (2015). RTS,S: Toward a first landmark on the Malaria Vaccine Technology Roadmap. *Vaccine*, 33(52), 7425–7432. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2015.09.061>

- Kehrer, J., Pietsch, E., Ricken, D., Strauss, L., Heinze, J. M., Gilberger, T., & Frischknecht, F. (2024). APEX-based proximity labeling in Plasmodium identifies a membrane protein with dual functions during mosquito infection. *PLoS Pathogens*, *20*(12), e1012788. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1012788>
- Kim, J., Tan, Y. Z., Wicht, K. J., Erramilli, S. K., Dhingra, S. K., Okombo, J., Vendome, J., Hagenah, L. M., Giacometti, S. I., Warren, A. L., Nosol, K., Roepe, P. D., Potter, C. S., Carragher, B., Kosiakoff, A. A., Quick, M., Fidock, D. A., & Mancina, F. (2019). Structure and drug resistance of the Plasmodium falciparum transporter PfCRT. *Nature*, *576*(7786), 315–320. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1795-X>
- Kiszewski, A., Mellinger, A., Spielman, A., Malaney, P., Sachs, S. E., & Sachs, J. (2004). A GLOBAL INDEX REPRESENTING THE STABILITY OF MALARIA TRANSMISSION. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *70*(5), 486–498. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.2004.70.486>
- Knuepfer, E., Wright, K. E., Prajapati, S. K., Rawlinson, T. A., Mohring, F., Koch, M., Lyth, O. R., Howell, S. A., Villasis, E., Snijders, A. P., Moon, R. W., Draper, S. J., Rosanas-Urgell, A., Higgins, M. K., Baum, J., & Holder, A. A. (2019). Divergent roles for the RH5 complex components, CyRPA and RIPR in human-infective malaria parasites. *PLoS Pathogens*, *15*(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007809>,
- Kolberg, L., Raudvere, U., Kuzmin, I., Adler, P., Vilo, J., & Peterson, H. (2023). G:Profiler-interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). *Nucleic Acids Research*, *51*(W1), W207–W212. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD347>,
- Kozma, D., Simon, I., & Tusnády, G. E. (2013). PDBTM: Protein Data Bank of transmembrane proteins after 8 years. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1169>
- Krotoski, W. A., Collins, W. E., Bray, R. S., Garnham, P. C., Cogswell, F. B., Gwadz, R. W., Killick-Kendrick, R., Wolf, R., Sinden, R., Koontz, L. C., & Stanfill, P. S. (1982). Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted Plasmodium vivax infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *31*(6), 1291–1293. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1982.31.1291>

- Külzer, S., Bittl, V., & Przyborski, J. M. (2015). Fractionation of Plasmodium-infected human red blood cells to study protein trafficking. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1270, 71–80. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2309-0_5,
- Külzer, S., Charnaud, S., Dagan, T., Riedel, J., Mandal, P., Pesce, E. R., Blatch, G. L., Crabb, B. S., Gilson, P. R., & Przyborski, J. M. (2012). Plasmodium falciparum-encoded exported hsp70/hsp40 chaperone/co-chaperone complexes within the host erythrocyte. *Cellular Microbiology*, 14(11), 1784–1795. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01840.x>
- Kumar, S., Kumar, M., Ekka, R., Dvorin, J. D., Paul, A. S., Madugundu, A. K., Gilberger, T., Gowda, H., Duraisingh, M. T., Keshava Prasad, T. S., & Sharma, P. (2017). PfCDPK1 mediated signaling in erythrocytic stages of Plasmodium falciparum. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-017-00053-1>,
- Kyes, S. A., Rowe, J. A., Kriek, N., & Newbold, C. I. (1999). Rifins: A second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with Plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9333–9338. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.16.9333/ASSET/BFC4B712-79FB-4D56-823C-1F72D22BFBD9/ASSETS/GRAPHIC/PQ1692436005.JPEG>
- LaCount, D. J., Vignali, M., Chettier, R., Phansalkar, A., Bell, R., Hesselberth, J. R., Schoenfeld, L. W., Ota, I., Sahasrabudhe, S., Kurschner, C., Fields, S., & Hughes, R. E. (2005). A protein interaction network of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature*, 438(7064), 103–107. <https://doi.org/10.1038/NATURE04104>,
- Lad, L., Mewies, M., & Raven, E. L. (2002). Substrate binding and catalytic mechanism in ascorbate peroxidase: evidence for two ascorbate binding sites. *Biochemistry*, 41(46), 13774–13781. <https://doi.org/10.1021/BI0261591>
- Lainhart, W., Bickersmith, S. A., Nadler, K. J., Moreno, M., Saavedra, M. P., Chu, V. M., Ribolla, P. E., Vinetz, J. M., & Conn, J. E. (2015). Evidence for temporal population replacement and the signature of ecological adaptation in a major Neotropical malaria vector in Amazonian Peru. *Malaria Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12936-015-0863-4>
- Lam, S. S., Martell, J. D., Kamer, K. J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Mootha, V. K.,

- & Ting, A. Y. (2014). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nature Methods*, 12(1), 51–54. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3179>
- Lambros, C., & Vanderberg, J. P. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology*, 65(3), 418–420. <https://doi.org/10.2307/3280287>
- Langhorne, J., Quin, S. J., & Sanni, L. A. (2002). Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chemical Immunology*, 80, 204–228. <https://doi.org/10.1159/000058845>
- Lanzillotti, R., & Coetzer, T. L. (2006). The 10 kDa domain of human erythrocyte protein 4.1 binds the *Plasmodium falciparum* EBA-181 protein. *Malaria Journal*, 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-100>
- Lasonder, E., Green, J. L., Camarda, G., Talabani, H., Holder, A. A., Langsley, G., & Alano, P. (2012). The *Plasmodium falciparum* schizont phosphoproteome reveals extensive phosphatidylinositol and cAMP-protein kinase A signaling. *Journal of Proteome Research*, 11(11), 5323–5337. <https://doi.org/10.1021/PR300557M>
- Laurens, M. B. (2020). RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(3). <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1669415>
- Lavery, C. B., Macinnis, M. C., Macdonald, M. J., Williams, J. B., Spencer, C. A., Burke, A. A., Irwin, D. J. G., & D’Cunha, G. B. (2010). Purification of peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8471–8476. <https://doi.org/10.1021/jf100786h>
- 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 (New York, N.Y.)*, 301(5639), 1503–1508. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1087025>
- Lee, W. C., Russell, B., & Rénia, L. (2019). Sticking for a cause: The *falciparum* malaria parasites cytoadherence paradigm. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01444>

- Leech, J. H., Barnwell, J. W., Miller, L. H., & Howard, R. J. (1984). Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, *159*(6), 1567–1575. <https://doi.org/10.1084/JEM.159.6.1567>
- Liffner, B., Frölich, S., Heinemann, G. K., Liu, B., Ralph, S. A., Dixon, M. W. A., Gilberger, T. W., & Wilson, D. W. (2020). PfCERLI1 is a conserved rhoptry associated protein essential for *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of erythrocytes. *Nature Communications*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/S41467-020-15127-W>;TECHMETA
- Lindner, S. E., Miller, J. L., & Kappe, S. H. I. (2012). Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cellular Microbiology*, *14*(3), 316–324. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2011.01734.X>
- Ling, I. T., Florens, L., Dluzewski, A. R., Kaneko, O., Grainger, M., Yim Lim, B. Y. S., Tsuboi, T., Hopkins, J. M., Johnson, J. R., Torii, M., Bannister, L. H., Yates, J. R., Holder, A. A., & Mattei, D. (2004). The *Plasmodium falciparum* clag9 gene encodes a rhoptry protein that is transferred to the host erythrocyte upon invasion. *Molecular Microbiology*, *52*(1), 107–118. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15049814/>
- Ling, I. T., Kaneko, O., Narum, D. L., Tsuboi, T., Howell, S., Taylor, H. M., Scott-Finnigan, T. J., Torii, M., & Holder, A. A. (2003). Characterisation of the rhoph2 gene of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *127*(1), 47–57. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00302-X](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00302-X)
- Lingelbach, K., & Joiner, K. A. (1998). The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *Journal of Cell Science*, *111* (Pt 11)(11), 1467–1475. <https://doi.org/10.1242/JCS.111.11.1467>
- Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I., & Lomize, A. L. (2012). OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Research*, *40*(D1), D370–D376. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR703>

- Loughlin, S. O. (2020). The expanding *Anopheles gambiae* species complex. *Pathogens and Global Health*, 114(1), 1. <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1722434>
- Lover, A. A., Baird, J. K., Gosling, R., & Price, R. N. (2018). Malaria Elimination: Time to Target All Species. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(1), 17–23. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0869>
- Luft, B. J., Jiang, W., Munoz, P., Dattwyler, R. J., & Gorevic, P. D. (1989). Biochemical and immunological characterization of the surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, 57(11), 3637–3645. <https://doi.org/10.1128/IAI.57.11.3637-3645.1989>,
- Lux, S. E., John, K. M., Kopito, R. R., & Lodish, H. F. (1989). Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(23), 9089–9093. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.23.9089>,
- Luzzatto, L., & Seneca, E. (2014). G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. *British Journal of Haematology*, 164(4), 469–480. <https://doi.org/10.1111/BJH.12665>
- MacKintosh, C. L., Beeson, J. G., & Marsh, K. (2004). Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in Parasitology*, 20(12), 597–603. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2004.09.006>
- Magowan, C., Coppel, R. L., Lau, A. O. T., Moronne, M. M., Tchernia, G., & Mohandas, N. (1995). Role of the Plasmodium falciparum Mature-Parasite - Infected Erythrocyte Surface Antigen (MESA/PfEMP-2) in Malarial Infection of Erythrocytes. *Blood*, 86(8), 3196–3204. <https://doi.org/10.1182/blood.v86.8.3196.bloodjournal8683196>
- Mandefro, A., Kebede, A. M., Katsvanga, M., Cham, F., Oriero, E., Amambua-Ngwa, A., & Golassa, L. (2025). Unveiling mismatch of RTS S AS01 and R21 Matrix M malaria vaccines haplotype among Ethiopian Plasmodium falciparum clinical isolates. *Scientific Reports*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-025-00140-0>,
- Marapana, D. S., Dagley, L. F., Sandow, J. J., Nebl, T., Triglia, T., Pasternak, M., Dickerman, B. K., Crabb, B. S., Gilson, P. R., Webb, A. I., Boddey, J. A., &

- Cowman, A. F. (2018). Plasmeprin V cleaves malaria effector proteins in a distinct endoplasmic reticulum translocation interactome for export to the erythrocyte. *Nature Microbiology*, 3(9), 1010–1022. <https://doi.org/10.1038/S41564-018-0219-2>
- Marinotti, O. (2021). What is in a name? *Anopheles darlingi* versus *Nyssorhynchus darlingi*. *Trends in Parasitology*, 37(10), 856–858. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.06.003>
- Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E., & Cowman, A. F. (2004). Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5703), 1930–1933. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.11102452>
- Martin, W. J., Finerty, J., & Rosenthal, A. (1971). Isolation of *Plasmodium berghei* (malaria) parasites by ammonium chloride lysis of infected erythrocytes. *Nature New Biology*, 233(43), 260–261. <https://doi.org/10.1038/NEWBIO233260A0>,
- Martinez, M., Chen, W. D., Cova, M. M., Molnár, P., Mageswaran, S. K., Guérin, A., John, A. R. O., Lebrun, M., & Chang, Y. W. (2022). Rhoptry secretion system structure and priming in *Plasmodium falciparum* revealed using in situ cryo-electron tomography. *Nature Microbiology*, 7(8), 1230–1238. <https://doi.org/10.1038/S41564-022-01171-3>
- Matesanz, F., Durán-Chica, I., & Alcina, A. (1999). The cloning and expression of Pfacs1, a *Plasmodium falciparum* fatty acyl coenzyme a synthetase-1 targeted to the host erythrocyte cytoplasm. *Journal of Molecular Biology*, 291(1), 59–70. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2964>
- Matthews, K., Kalanon, M., Chisholm, S. A., Sturm, A., Goodman, C. D., Dixon, M. W. A., Sanders, P. R., Nebl, T., Fraser, F., Haase, S., Mcfadden, G. I., Gilson, P. R., Crabb, B. S., & De Koning-Ward, T. F. (2013). The *Plasmodium* translocon of exported proteins (PTEX) component thioredoxin-2 is important for maintaining normal blood-stage growth. *Molecular Microbiology*, 89(6), 1167–1186. <https://doi.org/10.1111/MMI.12334>,
- Matthews, K. M., Pitman, E. L., & Koning-Ward, T. F. (2019). Illuminating how malaria parasites export proteins into host erythrocytes. *Cellular Microbiology*, 21(4). <https://doi.org/10.1111/cmi.13009>

- Matz, J. M., Beck, J. R., & Blackman, M. J. (2020). *The parasitophorous vacuole of the blood-stage malaria parasite*. *18(7)*, 379–391. <https://www.nature.com/articles/s41579-019-0321-3>
- Matz, J. M., Matuschewski, K., & Kooij, T. W. A. (2013). Two putative protein export regulators promote Plasmodium blood stage development in vivo. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *191(1)*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.09.003>
- Mayer, D. C. G., Cofie, J., Jiang, L., Hartl, D. L., Tracy, E., Kabat, J., Mendoza, L. H., & Miller, L. H. (2009). Glycophorin B is the erythrocyte receptor of Plasmodium falciparum erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106(13)*, 5348–5352. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900878106>
- McFadden, G. I. (2000). Mergers and acquisitions: malaria and the great chloroplast heist. *Genome Biology*, *1(4)*. <https://doi.org/10.1186/GB-2000-1-4-REVIEWS1026>
- McIntosh, M. T., Drozdowicz, Y. M., Laroia, K., Rea, P. A., & Vaidya, A. B. (2001). Two classes of plant-like vacuolar-type H⁺-pyrophosphatases in malaria parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *114(2)*, 183–195. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00251-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00251-1)
- Meerstein-Kessel, L., Venhuizen, J., Garza, D., Proelochs, N. I., Vos, E. J., Obiero, J. M., Felgner, P. L., Sauerwein, R. W., Peters, M., Yang, A. S. P., & Huynen, M. A. (2021). Novel insights from the Plasmodium falciparum sporozoite-specific proteome by probabilistic integration of 26 studies. *PLoS Computational Biology*, *17(4)*. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1008067>
- Mercier, C., Adjogble, K. D. Z., Däubener, W., & Delauw, M. F. C. (2005). Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *International Journal for Parasitology*, *35(8)*, 829–849. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2005.03.011>
- Mewara, A., Sreenivasan, P., & Khurana, S. (2023). Primate malaria of human importance. *Tropical Parasitology*, *13(2)*, 73–83. https://doi.org/10.4103/TP.TP_79_22

- Miao, J., & Cui, L. (2011). Rapid isolation of single malaria parasite-infected red blood cells by cell sorting. *Nature Protocols*, 6(2), 140. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2010.185>
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415(6872), 673–679. <https://doi.org/10.1038/415673a>
- Miller, R. M., Millikin, R. J., Rolfs, Z., Shortreed, M. R., & Smith, L. M. (2023). Enhanced Proteomic Data Analysis with MetaMorpheus. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2426, 35–66. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1967-4_3
- Milner, D. A. (2018). Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(1), a025569. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>
- Morita, M., Nagaoka, H., Ntege, E. H., Kanoi, B. N., Ito, D., Nakata, T., Lee, J. W., Tokunaga, K., Iimura, T., Torii, M., Tsuboi, T., & Takashima, E. (2018). PV1, a novel Plasmodium falciparum merozoite dense granule protein, interacts with exported protein in infected erythrocytes. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-22026-0>
- Moxon, C. A., Gibbins, M. P., McGuinness, D., Milner, D. A., & Marti, M. (2020). New Insights into Malaria Pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15, 315–343. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31648610/>
- Mphande, F. A., Ribacke, U., Kaneko, O., Kironde, F., Winter, G., & Wahlgren, M. (2008). SURFIN4.1, a schizont-merozoite associated protein in the SURFIN family of Plasmodium falciparum. *Malaria Journal*, 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-116>
- Mukherjee, S., Nasamu, A. S., Rubiano, K. C., & Goldberg, D. E. (2023). Activation of the Plasmodium Egress Effector Subtilisin-Like Protease 1 Is Mediated by Plasmepsin X Destruction of the Prodomain. *MBio*, 14(2). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00673-23>,
- Mukherjee, S., Nguyen, S., Sharma, E., & Goldberg, D. E. (2022). Maturation and substrate processing topography of the Plasmodium falciparum invasion/egress protease plasmepsin X. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-022-32271-7>,

- Mustafa, M. S. E. K., Jaal, Z., Abu Kashawa, S., & Mohd Nor, S. A. (2021). Population genetics of *Anopheles arabiensis*, the primary malaria vector in the Republic of Sudan. *Malaria Journal*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/S12936-021-03994-7>
- Nadeem, A. Y., Shehzad, A., Islam, S. U., Al-Suhaimi, E. A., & Lee, Y. S. (2022). Mosquirix™ RTS, S/AS01 Vaccine Development, Immunogenicity, and Efficacy. *Vaccines*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/VACCINES10050713>
- Nagar, R., Garcia Castillo, S. S., Pinzon-Ortiz, M., Patray, S., Coppi, A., Kanatani, S., Moritz, R. L., Swearingen, K. E., Ferguson, M. A. J., & Sinnis, P. (2024). The major surface protein of malaria sporozoites is GPI-anchored to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *300*(8). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107557>
- Naissant, B., Dupuy, F., Duffier, Y., Lorthiois, A., Duez, J., Scholz, J., Buffet, P., Merckx, A., Bachmann, A., & Lavazec, C. (2016). Plasmodium falciparum STEVOR phosphorylation regulates host erythrocyte deformability enabling malaria parasite transmission. *Blood*, *127*(24), e42–e53. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-01-690776>
- Nasamu, A. S., Glushakova, S., Russo, I., Vaupel, B., Oksman, A., Kim, A. S., Fremont, D. H., Tolia, N., Beck, J. R., Meyers, M. J., Niles, J. C., Zimmerberg, J., & Goldberg, D. E. (2017). Plasmepsins IX and X are essential and druggable mediators of malaria parasite egress and invasion. *Science*, *358*(6362), 518–522. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN1478>,
- Nastou, K. C., Tsaousis, G. N., & Iconomidou, V. A. (2020). PerMemDB: A database for eukaryotic peripheral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1862*(2), 183076. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2019.183076>
- Nessel, T., Beck, J. M. J. R., Rayatpisheh, S., Jami-Alahmadi, Y., Wohlschlegel, J. A., Goldberg, D. E., & Beck, J. M. J. R. (2020). EXP1 is required for organisation of EXP2 in the intraerythrocytic malaria parasite vacuole. *Cellular Microbiology*, *22*(5). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31990132/>
- Newbold, C. I., Craig, A. G., Kyes, S., Berendt, A. R., Snow, R. W., Peshu, N., & Marsh, K. (1997). PfEMP1, polymorphism and pathogenesis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, *91*(5), 551–557.

<https://doi.org/10.1080/00034983.1997.11813173>

- Newport, T. D., Sansom, M. S. P., & Stansfeld, P. J. (2019). The MemProtMD database: a resource for membrane-embedded protein structures and their lipid interactions. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D390–D397. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1047>
- Nguitragool, W., Bokhari, A. A. B., Pillai, A. D., Rayavara, K., Sharma, P., Turpin, B., Aravind, L., & Desai, S. A. (2011). Malaria parasite clag3 genes determine channel-mediated nutrient uptake by infected red blood cells. *Cell*, *145*(5), 665–677. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21620134/>
- Niang, M., Bei, A. K., Madhani, K. G., Pelly, S., Dankwa, S., Kanjee, U., Gunalan, K., Amaladoss, A., Yeo, K. P., Bob, N. S., Malleret, B., Duraisingh, M. T., & Preiser, P. R. (2014). STEVOR is a Plasmodium falciparum erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting. *Cell Host & Microbe*, *16*(1), 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.004>
- Nilsson Bark, S. K., Ahmad, R., Dantzler, K., Lukens, A. K., De Niz, M., Szucs, M. J., Jin, X., Cotton, J., Hoffmann, D., Bric-Furlong, E., Oomen, R., Parrington, M., Milner, D., Neafsey, D. E., Carr, S. A., Wirth, D. F., & Marti, M. (2018). Quantitative proteomic profiling reveals novel plasmodium falciparum surface antigens and possible vaccine candidates. *Molecular and Cellular Proteomics*, *17*(1), 43–60. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000076>
- Nofal, S. D., Patel, A., Blackman, M. J., Flueck, C., & Baker, D. A. (2021). Plasmodium falciparum guanylyl cyclase-alpha and the activity of its appended P4-ATPase domain are essential for cGMP synthesis and blood-stage egress. *MBio*, *12*(1), 1–19. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33500341/>
- Nomura, T., Carlton, J. M. R., Baird, J. K., Del Portillo, H. A., Fryauff, D. J., Rathore, D., Fidock, D. A., Su, X. Z., Collins, W. E., McCutchan, T. F., Wootton, J. C., & Wellems, T. E. (2001). Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 Plasmodium species that cause human malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, *183*(11), 1653–1661. <https://doi.org/10.1086/320707>
- Nyalwidhe, J., Baumeister, S., Hibbs, A. R., Tawill, S., Papakrivos, J., Volker, U., Lingelbach, K., Völker, U., & Lingelbach, K. (2002). A nonpermeant biotin

- derivative gains access to the parasitophorous vacuole in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes permeabilized with streptolysin O. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 40005–40011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207077200>
- O'Donnell, R. A., De Koning-Ward, T. F., Burt, R. A., Bockarie, M., Reeder, J. C., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2001). Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(12), 1403–1412. <https://doi.org/10.1084/JEM.193.12.1403>
- Orioli, T., & Vihinen, M. (2019). Benchmarking subcellular localization and variant tolerance predictors on membrane proteins. *BMC Genomics*, 20(8), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12864-019-5865-0/TABLES/8>
- Othman, B., Zeef, L., Szeszak, T., Rchiad, Z., Storm, J., Askonas, C., Satyam, R., Madkhali, A., Haley, M., Wagstaff, S., Couper, K., Pain, A., & Craig, A. (2023). Different PfEMP1-expressing *Plasmodium falciparum* variants induce divergent endothelial transcriptional responses during co-culture. *PLoS ONE*, 18(11 November). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295053>
- Ouji, M., Augereau, J. M., Paloque, L., & Benoit-Vical, F. (2018). *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies: A sword of Damocles in the path toward malaria elimination. *Parasite (Paris, France)*, 25. <https://doi.org/10.1051/PARASITE/2018021>
- Ouologuem, D. T., Dara, A., Kone, A., Ouattara, A., & Djimde, A. A. (2023). *Plasmodium falciparum* Development from Gametocyte to Oocyst: Insight from Functional Studies. *Microorganisms*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11081966>
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A. L. (2006). How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(12), 993–996. <https://doi.org/10.1038/nrd2199>
- Pacheco, M. A., Lopez-Perez, M., Vallejo, A. F., Herrera, S., Arévalo-Herrera, M., & Escalante, A. A. (2016). Multiplicity of Infection and Disease Severity in *Plasmodium vivax*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0004355>

- Pasloske, B. L., & Howard, R. J. (1994). Malaria, the red cell, and the endothelium. *Annual Review of Medicine*, *45*, 283–295. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.45.1.283>
- Pasvol, G., Wainscoat, J. S., & Weatherall, D. J. (1982). Erythrocytes deficient in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, *297*(5861), 64–66. <https://doi.org/10.1038/297064A0>,
- Paul, A. S., Miliu, A., Paulo, J. A., Goldberg, J. M., Bonilla, A. M., Berry, L., Seveno, M., Braun-Breton, C., Kosber, A. L., Elsworth, B., Arriola, J. S. N., Lebrun, M., Gygi, S. P., Lamarque, M. H., & Duraisingh, M. T. (2020). Co-option of *Plasmodium falciparum* PP1 for egress from host erythrocytes. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-17306-1>,
- Pei, X., Guo, X., Coppel, R., Bhattacharjee, S., Haldar, K., Gratzer, W., Mohandas, N., & An, X. (2007). The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum* stabilizes spectrin tetramers and suppresses further invasion. *Blood*, *110*(3), 1036–1042. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17468340/>
- Perrin, A. J., Collins, C. R., Russell, M. R. G., Collinson, L. M., Baker, D. A., & Blackman, M. J. (2018). The actinomyosin motor drives malaria parasite red blood cell invasion but not egress. *MBio*, *9*(4). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00905-18>,
- Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I., & Hellen, C. U. T. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(13), 7029–7036. <https://doi.org/10.1073/PNAS.111145798>,
- Petersen, W., Külzer, S., Engels, S., Zhang, Q., Ingmundson, A., Rug, M., Maier, A. G., & Przyborski, J. M. (2016). J-dot targeting of an exported HSP40 in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *International Journal for Parasitology*, *46*(8), 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.03.005>
- Phillips, M. A., Burrows, J. N., Manyando, C., van Huijsduijnen, R. H., Van Voorhis, W. C., & Wells, T. N. C. (2017). Malaria. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(1), 17050. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>
- Pinder, J. C., Fowler, R. E., Dluzewski, A. R., Bannister, L. H., Lavin, F. M., Mitchell, G. H., Wilson, R. J. M., & Gratzer, W. B. (1998). Actomyosin motor in the

- merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: Implications for red cell invasion. *Journal of Cell Science*, 111(13), 1831–1839. <https://doi.org/10.1242/JCS.111.13.1831>,
- Promega. (1998). *Sequencing Grade Modified Trypsin Certificate of Analysis 9PIV511*. www.promega.com
- Prudêncio, M., Rodriguez, A., & Mota, M. M. (2006). The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(11), 849–856. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO1529>
- Quevillon, E., Spielmann, T., Brahimi, K., Chattopadhyay, D., Yeramian, E., & Langsley, G. (2003). The *Plasmodium falciparum* family of Rab GTPases. *Gene*, 306(1–2), 13–25. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00381-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00381-0)
- Quintero-Ferrer, J. M., Silva De Oliveira, L., Marian, P., Goulart, V., Albuquerque, T., Campos, S., Martin, C., Grellier, P., Marques, I., Bastos, D., & Charneau, S. (2025). Next-Generation Protein–Ligand Interaction Networks: APEX as a Powerful Technology. *Proteomes 2025, Vol. 13, Page 26*, 13(3), 26. <https://doi.org/10.3390/PROTEOMES13030026>
- Radfar, A., Méndez, D., Moneriz, C., Linares, M., Marín-García, P., Puyet, A., Diez, A., & Bautista, J. M. (2009). Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. *Nature Protocols*, 4(12), 1899–1915. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2009.198>
- Rafiee, M., Sigismondo, G., Kalxdorf, M., Förster, L., Brügger, B., Béthune, J., & Krijgsveld, J. (2020). Protease-resistant streptavidin for interaction proteomics. *Molecular Systems Biology 2020 16:5*, 16(5), MSB199370-. <https://doi.org/10.15252/msb.20199370>
- Ragotte, R. J., Higgins, M. K., & Draper, S. J. (2020). The RH5-CyRPA-Ripr Complex as a Malaria Vaccine Target. *Trends in Parasitology*, 36(6), 545–559. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.003>
- Ralph, S. A., van Dooren, G. G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M. J., Foth, B. J., Tonkin, C. J., Roos, D. S., & McFadden, G. I. (2004). Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(3), 203–216.

<https://doi.org/10.1038/NRMICRO843>

- Rappsilber, J., Mann, M., & Ishihama, Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*, 2(8), 1896–1906. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17703201/>
- Rask, T. S., Hansen, D. A., Theander, T. G., Pedersen, A. G., & Lavstsen, T. (2010). Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Diversity in Seven Genomes – Divide and Conquer. *PLoS Computational Biology*, 6(9), e1000933. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1000933>
- Rawat, R. S., Gupta, A., Antil, N., Bhatnagar, S., Singh, M., Rawat, A., Prasad, T. S. K., & Sharma, P. (2023). Protein kinase PfPK2 mediated signalling is critical for host erythrocyte invasion by malaria parasite. *PLoS Pathogens*, 19(11), e1011770. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1011770>
- Recht, J., Ashley, E. A., & White, N. J. (2018). Use of primaquine and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency testing: Divergent policies and practices in malaria endemic countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(4), e0006230. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0006230>
- Renuse, S., Madugundu, A. K., Jung, J. H., Byeon, S. K., Goldschmidt, H. L., Tahir, R., Meyers, D., Kim, D. I., Cutler, J., Kim, K. P., Wu, X., Hugarir, R. L., & Pandey, A. (2020). Signature Fragment Ions of Biotinylated Peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 31(2), 394–404. <https://doi.org/10.1021/JASMS.9B00024>
- Rhee, H. W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2013). Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science*, 339(6125), 1328–1331. <https://doi.org/10.1126/science.1230593>
- Richard, D., Kats, L. M., Langer, C., Black, C. G., Mitri, K., Boddey, J. A., Cowman, A. F., & Coppel, R. L. (2009). Identification of rhoptry trafficking determinants and evidence for a novel sorting mechanism in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *PLoS Pathogens*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000328>

- Riglar, D. T., Richard, D., Wilson, D. W., Boyle, M. J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., Angrisano, F., Marapana, D. S., Rogers, K. L., Whitchurch, C. B., Beeson, J. G., Cowman, A. F., Ralph, S. A., & Baum, J. (2011). Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host & Microbe*, 9(1), 9–20. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2010.12.003>
- Rosenthal, P. J., Asua, V., & Conrad, M. D. (2024). Emergence, transmission dynamics and mechanisms of artemisinin partial resistance in malaria parasites in Africa. *Nature Reviews. Microbiology*, 22(6), 373–384. <https://doi.org/10.1038/S41579-024-01008-2>
- Roux-Dalvai, F., de Peredo, A. G., Simó, C., Guerrier, L., Bouyssié, D., Zanella, A., Citterio, A., Burlet-Schiltz, O., Boschetti, E., Righetti, P. G., & Monsarrat, B. (2008). Extensive analysis of the cytoplasmic proteome of human erythrocytes using the peptide ligand library technology and advanced mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7(11), 2254–2269. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800037-MCP200>
- RTS, S. C. T. P. (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet (London, England)*, 386(9988), 31–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60721-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8)
- Rudashevskaya, E. L., Sacco, R., Kratochwill, K., Huber, M. L., Gstaiger, M., Superti-Furga, G., & Bennett, K. L. (2013). A method to resolve the composition of heterogeneous affinity-purified protein complexes assembled around a common protein by chemical cross-linking, gel electrophoresis and mass spectrometry. *Nature Protocols*, 8(1), 75–97. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2012.133>,
- Ruecker, A., Shea, M., Hackett, F., Suarez, C., Hirst, E. M. A., Milutinovic, K., Withers-Martinez, C., & Blackman, M. J. (2012). Proteolytic activation of the essential parasitophorous vacuole cysteine protease SERA6 accompanies malaria parasite egress from its host erythrocyte. *Journal of Biological Chemistry*, 287(45), 37949–37963. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400820>
- Rug, M., Prescott, S. W., Fernandez, K. M., Cooke, B. M., & Cowman, A. F. (2006). The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P falciparum*-

- infected human erythrocytes. *Blood*, 108(1), 370–378.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-11-4624>,
- Sabarth, N., Lamer, S., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P. R., Meyer, T. F., & Bumann, D. (2002). Identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 27896–27902.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M204473200>,
- Sahu, W., Bai, T., Das, A., Mukherjee, S., Prusty, A., Mallick, N. R., Elangovan, S., & Reddy, K. S. (2024). Plasmodium falciparum J-dot localized J domain protein A8iJp modulates the chaperone activity of human HSPA8. *FEBS Letters*, 598(7), 818–836. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14836>,
- Sanders, P. R., Cantin, G. T., Greenbaum, D. C., Gilson, P. R., Nebl, T., Moritz, R. L., Yates, J. R., Hodder, A. N., & Crabb, B. S. (2007). Identification of protein complexes in detergent-resistant membranes of *Plasmodium falciparum* schizonts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 154(2), 148–157.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.04.013>
- Sarti, E., Aleksandrova, A. A., Ganta, S. K., Yavatkar, A. S., & Forrest, L. R. (2019). EncoMPASS: an online database for analyzing structure and symmetry in membrane proteins. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D315–D321.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKY952>
- Scally, S. W., Triglia, T., Evelyn, C., Seager, B. A., Pasternak, M., Lim, P. S., Healer, J., Geoghegan, N. D., Adair, A., Tham, W. H., Dagley, L. F., Rogers, K. L., & Cowman, A. F. (2022). PCRCR complex is essential for invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Nature Microbiology*, 7(12), 2039–2053.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36396942/>
- Schiapparelli, L. M., McClatchy, D. B., Liu, H. H., Sharma, P., Yates, J. R., & Cline, H. T. (2014). Direct detection of biotinylated proteins by mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 13(9), 3966–3978. <https://doi.org/10.1021/PR5002862>
- Schnider, C. B., Bausch-Fluck, D., Brühlmann, F., Heussler, V. T., & Burda, P.-C. (2018). BioID Reveals Novel Proteins of the Plasmodium Parasitophorous Vacuole Membrane. *MSphere*, 3(1). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00522-17>

- Schulze, J., Kwiatkowski, M., Borner, J., Schlüter, H., Bruchhaus, I., Burmester, T., Spielmann, T., & Pick, C. (2015). The Plasmodium falciparum exportome contains non-canonical PEXEL/HT proteins. *Molecular Microbiology*, *97*(2), 301–314. <https://doi.org/10.1111/MMI.13024>
- Seeman, P., Cheng, D., & Iles, G. H. (1973). Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *Journal of Cell Biology*, *56*(2), 519–527. <https://doi.org/10.1083/JCB.56.2.519>,
- Senczuk, A. M., Reeder, J. C., Kosmala, M. M., & Ho, M. (2001). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 functions as a ligand for P-selectin. *Blood*, *98*(10), 3132–3135. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V98.10.3132>
- Sferra, G., Fratini, F., Birago, C., Megliorini, L., Mochi, S., Lalle, M., Paone, S., Olivieri, A., Ferreri, C., Sansone, A., Ponzi, M., Currà, C., & Pizzi, E. (2025). Dynamics of detergent-resistant membranes of Plasmodium falciparum during blood stage development. *Scientific Reports*, *15*(1), 34553. <https://doi.org/10.1038/S41598-025-17908-Z>
- Shakya, B., Patel, S. D., Tani, Y., & Egan, E. S. (2021). Erythrocyte cd55 mediates the internalization of plasmodium falciparum parasites. *ELife*, *10*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.61516>,
- Shakya, B., Penn, W. D., Nakayasu, E. S., & LaCount, D. J. (2017). The Plasmodium falciparum exported protein PF3D7_0402000 binds to erythrocyte ankyrin and band 4.1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *216*, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.06.002>
- Shao, J. (2022). Labeling Strategies for Surface-Exposed Protein Visualization and Determination in Plasmodium falciparum Malaria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 914297. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.914297>
- Sharling, L., Sowa, K. M. P., Thompson, J., Kyriacou, H. M., & Arnot, D. E. (2007). Rapid and specific biotin labelling of the erythrocyte surface antigens of both cultured and ex-vivo Plasmodium parasites. *Malaria Journal*, *6*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-66>,
- Sharma, P., Rayavara, K., Ito, D., Basore, K., & Desai, S. A. (2015). A CLAG3 mutation in an amphipathic transmembrane domain alters malaria parasite nutrient

- channels and confers leupeptin resistance. *Infection and Immunity*, 83(6), 2566–2574. <https://doi.org/10.1128/IAI.02966-14>,
- Sharma, Y. D. (1997). Knob proteins in falciparum malaria. *The Indian Journal of Medical Research*, 106(AUG.), 53–62. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9291676/>
- Shaw, P. J., Ponmee, N., Karoonuthaisiri, N., Kamchonwongpaisan, S., & Yuthavong, Y. (2007). Characterization of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* eIF4E homologue and mRNA 5' cap status. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 155(2), 146–155. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2007.07.003>,
- Sheiner, L., Vaidya, A. B., & McFadden, G. I. (2013). The metabolic roles of the endosymbiotic organelles of *Toxoplasma* and *Plasmodium* spp. *Current Opinion in Microbiology*, 16(4), 452–458. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2013.07.003>
- Sherling, E. S., Knuepfer, E., Brzostowski, J. A., Miller, L. H., Blackman, M. J., & Van Ooij, C. (2017). The *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RhopH3 plays essential roles in host cell invasion and nutrient uptake. *ELife*, 6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28252384/>
- Sherling, E. S., Perrin, A. J., Knuepfer, E., Russell, M. R. G., Collinson, L. M., Miller, L. H., & Blackman, M. J. (2019). The *Plasmodium falciparum* rhoptry bulb protein RAMA plays an essential role in rhoptry neck morphogenesis and host red blood cell invasion. *PLoS Pathogens*, 15(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008049>
- Shimizu, S., Kikuchi, T., Koga, M., Kato, Y., Matsuoka, H., Maruyama, H., & Kimura, M. (2015). Optimal primaquine use for radical cure of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* malaria in Japanese travelers - A retrospective analysis. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 13(3), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2014.11.005>
- Siau, A., Ang, J. W., Sheriff, O., Hoo, R., Loh, H. P., Tay, D., Huang, X., Yam, X. Y., Lai, S. K., Meng, W., Julca, I., Kwan, S. S., Mutwil, M., & Preiser, P. R. (2023). Comparative spatial proteomics of *Plasmodium*-infected erythrocytes. *Cell Reports*, 42(11). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113419>
- Sim, B. K. L., Chitnis, C. E., Wasniowska, K., Hadley, T. J., & Miller, L. H. (1994).

- Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science*, 264(5167), 1941–1944.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8009226>,
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Okara, R. M., Van Boeckel, T., Godfray, H. C. J., Harbach, R. E., & Hay, S. I. (2010). The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors*, 3(1).
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-117>
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Burkot, T. R., Harbach, R. E., & Hay, S. I. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5(1).
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-69>
- Slater, A. F. G. (1993). Chloroquine: Mechanism of drug action and resistance in *plasmodium falciparum*. *Pharmacology and Therapeutics*, 57(2–3), 203–235.
[https://doi.org/10.1016/0163-7258\(93\)90056-J](https://doi.org/10.1016/0163-7258(93)90056-J)
- Smith, J. D., Chitnis, C. E., Craig, A. G., Roberts, D. J., Hudson-Taylor, D. E., Peterson, D. S., Pinches, R., Newbold, C. I., & Miller, L. H. (1995). Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*, 82(1), 101–110.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90056-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90056-X)
- Solntsev, S. K., Shortreed, M. R., Frey, B. L., & Smith, L. M. (2018). Enhanced Global Post-translational Modification Discovery with MetaMorpheus. *Journal of Proteome Research*, 17(5), 1844–1851.
<https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.7B00873>
- Spadeto, J. P. M., Cormanich, R. A., Franca, T. C. C., LaPlante, S. R., & Goncalves, A. S. (2022). Docking and molecular dynamics studies of potential new leads against DBL3x derived from chondroitin sulfate A (CSA): a new approach for the treatment of malaria. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(18), 8384–8393. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1911859>,

- Spillman, N. J., Beck, J. R., & Goldberg, D. E. (2015). Protein export into malaria parasite-infected erythrocytes: mechanisms and functional consequences. *Annual Review of Biochemistry*, *84*, 813–841. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060614-034157>
- Spycher, C., Rug, M., Pachlatko, E., Hanssen, E., Ferguson, D., Cowman, A. F., Tilley, L., & Beck, H. P. (2008). The Maurer's cleft protein MAHRP1 is essential for trafficking of PfEMP1 to the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Molecular Microbiology*, *68*(5), 1300–1314. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06235.x>
- Srinivasan, P., Beatty, W. L., Diouf, A., Herrera, R., Ambroggio, X., Moch, J. K., Tyler, J. S., Narum, D. L., Pierce, S. K., Boothroyd, J. C., Haynese, J. D., & Millera, L. H. (2011). Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(32), 13275–13280. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1110303108>,
- Stansfeld, P. J., Goose, J. E., Caffrey, M., Carpenter, E. P., Parker, J. L., Newstead, S., & Sansom, M. S. P. (2015). MemProtMD: Automated Insertion of Membrane Protein Structures into Explicit Lipid Membranes. *Structure*, *23*(7), 1350–1361. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.05.006>
- Stanway, R. R., Witt, T., Zobiak, B., Aepfelbacher, M., & Heussler, V. T. (2009). GFP-targeting allows visualization of the apicoplast throughout the life cycle of live malaria parasites. *Biology of the Cell*, *101*(7), 415–435. <https://doi.org/10.1042/BC20080202>
- Suarez, C., Lentini, G., Ramaswamy, R., Maynadier, M., Aquilini, E., Berry-Sterkers, L., Cipriano, M., Chen, A. L., Bradley, P., Striepen, B., Boulanger, M. J., & Lebrun, M. (2019). A lipid-binding protein mediates rhoptry discharge and invasion in Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii parasites. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-11979-Z>
- Suttapitugsakul, S., Xiao, H., Smeekens, J., & Wu, R. (2017). Evaluation and optimization of reduction and alkylation methods to maximize peptide identification with MS-based proteomics. *Molecular BioSystems*, *13*(12), 2574.

<https://doi.org/10.1039/c7mb00393e>

- Suurbaar, J., Moussiliou, A., Tahar, R., Olsen, R. W., Adams, Y., Dalgaard, N., Baafour, E. K., Adukpo, S., Hviid, L., Kusi, K. A., Alao, J., Ofori, M. F., Ndam, N. T., & Jensen, A. R. (2022). ICAM-1-binding Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 variants elicits opsonic-phagocytosis IgG responses in Beninese children. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-022-16305-0>
- Tazi, L., & Ayala, F. J. (2011). Unresolved direction of host transfer of Plasmodium vivax v. P. simium and P. malariae v. P. brasilianum. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *11*(1), 209–221. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2010.08.007>
- Tolia, N. H., Enemark, E. J., Sim, B. K. L., & Joshua-Tor, L. (2005). Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Cell*, *122*(2), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.033>
- Torres, K., Ferreira, M. U., Castro, M. C., Escalante, A. A., Conn, J. E., Villasis, E., da Silva Araujo, M., Almeida, G., Rodrigues, P. T., Corder, R. M., Fernandes, A. R. J., Calil, P. R., Ladeia, W. A., Garcia-Castillo, S. S., Gomez, J., do Valle Antonelli, L. R., Gazzinelli, R. T., Golenbock, D. T., Llanos-Cuentas, A., ... Vinetz, J. M. (2022). Malaria Resilience in South America: Epidemiology, Vector Biology, and Immunology Insights from the Amazonian International Center of Excellence in Malaria Research Network in Peru and Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *107*(4 Suppl), 168. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.22-0127>
- Trager, W., Rozario, C., Shio, H., Williams, J., & Perkins, M. E. (1992). Transfer of a dense granule protein of Plasmodium falciparum to the membrane of ring stages and isolation of dense granules. *Infection and Immunity*, *60*(11), 4656–4661. <https://doi.org/10.1128/IAI.60.11.4656-4661.1992>
- Trager, William, & Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, *193*(4254), 673–675. <https://doi.org/10.1126/science.781840>
- Tusnády, G. E., Dosztányi, Z., & Simon, I. (2005). PDB_TM: Selection and membrane

- localization of transmembrane proteins in the protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 33(DATABASE ISS.). <https://doi.org/10.1093/nar/gki002>
- Tuteja, R. (2007). Unraveling the components of protein translocation pathway in human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 467(2), 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.08.031>
- Udeshi, N. D., Pedram, K., Svinkina, T., Fereshetian, S., Myers, S. A., Aygun, O., Krug, K., Clauser, K., Ryan, D., Ast, T., Mootha, V. K., Ting, A. Y., & Carr, S. A. (2017). Antibodies to biotin enable large-scale detection of biotinylation sites on proteins. *Nature Methods*, 14(12), 1167–1170. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4465>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I. M., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A. K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260419>,
- Vallese, F., Kim, K., Yen, L. Y., Johnston, J. D., Noble, A. J., Calì, T., & Clarke, O. B. (2022). Architecture of the human erythrocyte ankyrin-1 complex. *Nature Structural and Molecular Biology*, 29(7), 706–718. <https://doi.org/10.1038/S41594-022-00792-W>,
- Vallintine, T., & van Ooij, C. (2023). Timing of dense granule biogenesis in asexual malaria parasites. *Microbiology (United Kingdom)*, 169(8). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001389>
- van Ooij, C., Tamez, P., Bhattacharjee, S., Hiller, N. L., Harrison, T., Liolios, K., Kooij, T., Ramesar, J., Balu, B., Adams, J., Waters, A., Janse, C., & Haldar, K. (2008). The Malaria Secretome: From Algorithms to Essential Function in Blood Stage Infection. *PLoS Pathogens*, 4(6), e1000084. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000084>
- Van Spaendonk, R. M. L., Ramesar, J., Van Wigcheren, A., Eling, W., Beetsma, A. L., Van Gemert, G. J., Hooghof, J., Janse, C. J., & Waters, A. P. (2001). Functional Equivalence of Structurally Distinct Ribosomes in the Malaria Parasite, *Plasmodium berghei*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22638–22647. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101234200>

- Volz, J. C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J. K., Lim, N. T. Y., Whitehead, L. W., Chen, L., Lampe, M., Tham, W. H., Wilson, D., Nebl, T., Marapana, D., Triglia, T., Wong, W., Rogers, K. L., & Cowman, A. F. (2016). Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *Cell Host and Microbe*, 20(1), 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.004>
- Wahlgren, M., Goel, S., & Akhouri, R. R. (2017). Variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* and their roles in severe malaria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(8), 479–491. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.47>
- Waller, K. L., Cooke, B. M., Nunomura, W., Mohandas, N., & Coppel, R. L. (1999). Mapping the binding domains involved in the interaction between the *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and the cytoadherence ligand P. *falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23808–23813. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23808>
- Waller, K. L., Nunomura, W., An, X., Cooke, B. M., Mohandas, N., & Coppel, R. L. (2003). Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) of *Plasmodium falciparum* binds to the 30-kDa domain of protein 4.1 in malaria-infected red blood cells. *Blood*, 102(5), 1911–1914. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3513>
- Waller, R. F., Reed, M. B., Cowman, A. F., & McFadden, G. I. (2000). Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *The EMBO Journal*, 19(8), 1794–1802. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.8.1794>
- Wang, Q., Fujioka, H., & Nussenzweig, V. (2005). Mutational analysis of the GPI-anchor addition sequence from the circumsporozoite protein of *Plasmodium*. *Cellular Microbiology*, 7(11), 1616–1626. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2005.00579.X>
- Warncke, J. D., & Beck, H.-P. (2019). Host Cytoskeleton Remodeling throughout the Blood Stages of *Plasmodium falciparum*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 83(4). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-19>
- Warncke, J. D., Vakonakis, I., & Beck, H.-P. (2016). *Plasmodium* Helical Interspersed

- Subtelomeric (PHIST) Proteins, at the Center of Host Cell Remodeling. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(4), 905–927. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-16>,
- Watermeyer, J. M., Hale, V. L., Hackett, F., Clare, D. K., Cutts, E. E., Vakonakis, I., Fleck, R. A., Blackman, M. J., & Saibil, H. R. (2016). A spiral scaffold underlies cytoadherent knobs in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Blood*, 127(3), 343–351. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-674002>
- Watson, J., Taylor, W. R. J., Menard, D., Kheng, S., & White, N. J. (2017). Modelling primaquine-induced haemolysis in G6PD deficiency. *ELife*, 6, e23061. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.23061>
- Waweru, H., Kanoi, B. N., Kuja, J. O., Maranga, M., Kongere, J., Maina, M., Kinyua, J., & Gitaka, J. (2023). Limited genetic variations of the Rh5-CyRPA-Ripr invasion complex in *Plasmodium falciparum* parasite population in selected malaria-endemic regions, Kenya. *Frontiers in Tropical Diseases*, 4. <https://doi.org/10.3389/FITD.2023.1102265>
- Weatherall, D. J., Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., Doumbo, O. K., Casals-Pascual, C., & Roberts, D. J. (2002). Malaria and the red cell. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 35–57. <https://doi.org/10.1182/ASHEDUCATION-2002.1.35>
- Weng, H., Guo, X., Papoin, J., Wang, J., Coppel, R., Mohandas, N., & An, X. (2014). Interaction of *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) with erythrocyte ankyrin R is required for its attachment to the erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(1 PARTB), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.09.014>
- WHO. (2021). *World Malaria Report 2021*.
- WHO. (2024). *World Malaria Report 2024*. <https://www.who.int/amc/en/mediation/%0Ahttps://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>
- Wilchek, M., & Bayer, E. A. (1988). The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Analytical Biochemistry*, 171(1), 1–32. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90120-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90120-0),

- Williams, B. G., King, L. D. W., Pulido, D., Quinkert, D., Lias, A. M., Silk, S. E., Ragotte, R. J., Davies, H., Barrett, J. R., McHugh, K., Rigby, C. A., Alanine, D. G. W., Barfod, L., Shea, M. W., Cowley, L. A., Dabbs, R. A., Pattinson, D. J., Douglas, A. D., Lyth, O. R., ... Draper, S. J. (2024). Development of an improved blood-stage malaria vaccine targeting the essential RH5-CyRPA-RIPR invasion complex. *Nature Communications*, *15*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-024-48721-3>,
- Wilson, R. J. M. (Iain.), Denny, P. W., Preiser, P. R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D. J., Moore, P. W., & Williamson, D. H. (1996). Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Molecular Biology*, *261*(2), 155–172. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0449>
- Winograd, E., & Sherman, I. W. (2004). Malaria infection induces a conformational change in erythrocyte band 3 protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *138*(1), 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.07.008>
- Winter, G., Chen, Q., Flick, K., Kremsner, P., Fernandez, V., & Wahlgren, M. (2003). The 3D7var5.2 (varCOMMON) type var gene family is commonly expressed in non-placental *Plasmodium falciparum* malaria. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *127*(2), 179–191. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00004-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00004-5)
- Winter, G., Kawai, S., Haeggström, M., Kaneko, O., Von Euler, A., Kawazu, S. I., Palm, D., Fernandez, V., & Wahlgren, M. (2005). SURFIN is a polymorphic antigen expressed on *Plasmodium falciparum* merozoites and infected erythrocytes. *Journal of Experimental Medicine*, *201*(11), 1853–1863. <https://doi.org/10.1084/JEM.20041392>,
- Wirth, C. C., Glushakova, S., Scheuermayer, M., Repnik, U., Garg, S., Schaack, D., Kachman, M. M., Weißbach, T., Zimmerberg, J., Dandekar, T., Griffiths, G., Chitnis, C. E., Singh, S., Fischer, R., & Pradel, G. (2014). Perforin-like protein PPLP2 permeabilizes the red blood cell membrane during egress of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Cellular Microbiology*, *16*(5), 709–733. <https://doi.org/10.1111/CMI.12288>,
- Wiser, M. F. (2023). Knobs, Adhesion, and Severe *Falciparum* Malaria. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, *8*(7).

<https://doi.org/10.3390/TROPICALMED8070353>

- Wiser, M. F. (2024). The Digestive Vacuole of the Malaria Parasite: A Specialized Lysosome. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS13030182>
- Witmer, K., Schmid, C. D., Brancucci, N. M. B., Luah, Y. H., Preiser, P. R., Bozdech, Z., & Voss, T. S. (2012). Analysis of subtelomeric virulence gene families in *Plasmodium falciparum* by comparative transcriptional profiling. *Molecular Microbiology*, 84(2), 243. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2012.08019.X>
- Wong, W., Bai, X. C., Brown, A., Fernandez, I. S., Hanssen, E., Condrón, M., Tan, Y. H., Baum, J., & Scheres, S. H. W. (2014). Cryo-EM structure of the *Plasmodium falciparum* 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine. *ELife*, 2014(3). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.03080>,
- Wong, W., Bai, X. C., Sleebs, B. E., Triglia, T., Brown, A., Thompson, J. K., Jackson, K. E., Hanssen, E., Marapana, D. S., Fernandez, I. S., Ralph, S. A., Cowman, A. F., Scheres, S. H. W., & Baum, J. (2017). Mefloquine targets the *Plasmodium falciparum* 80S ribosome to inhibit protein synthesis. *Nature Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.1038/NMICROBIOL.2017.31>,
- Wunderlich, J. (2022). Updated List of Transport Proteins in *Plasmodium falciparum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12(June), 926541. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926541>
- Yadav, N., Singh, D., Singh, R., & Tyagi, Y. K. (2025). Progress in Synthesis and Therapeutic Applications of Mefloquine: A Review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 25. <https://doi.org/10.2174/0115680266389780250828104634>
- Yadavalli, R., Peterson, J. W., Drazba, J. A., & Sam-Yellowe, T. Y. (2021). Trafficking and Association of *Plasmodium falciparum* MC-2TM with the Maurer's Clefts. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(4), 1–27. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040431>
- Yang, Z., Zeng, X., Zhao, Y., & Chen, R. (2023). AlphaFold2 and its applications in the fields of biology and medicine. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01381-z>

- Yap, N. J., Hossain, H., Nada-Raja, T., Ngui, R., Muslim, A., Hoh, B.-P., Khaw, L. T., Kadir, K. A., Simon Divis, P. C., Vythilingam, I., Singh, B., & Lim, Y. A.-L. (2021). Natural Human Infections with *Plasmodium cynomolgi*, *P. inui*, and 4 other Simian Malaria Parasites, Malaysia. *Emerging Infectious Diseases*, 27(8), 2187–2191. <https://doi.org/10.3201/eid2708.204502>
- Yildirim, M. A., Goh, K. II, Cusick, M. E., Barabási, A. L., & Vidal, M. (2007). Drug-target network. *Nature Biotechnology*, 25(10), 1119–1126. <https://doi.org/10.1038/NBT1338>,
- Zhang, H., Tang, X., Munske, G. R., Tolic, N., Anderson, G. A., & Bruce, J. E. (2009). Identification of protein-protein interactions and topologies in living cells with chemical cross-linking and mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics*, 8(3), 409–420. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800232-MCP200>
- Zhao, Y., Franklin, R. M., & Kappes, B. (1994). *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase phosphorylates proteins of the host erythrocytic membrane. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66(2), 329–343. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90159-7),
- Zheng, D., Liu, T., Yu, S., Liu, Z., Wang, J., & Wang, Y. (2024). Antimalarial Mechanisms and Resistance Status of Artemisinin and Its Derivatives. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/TROPICALMED9090223>
- Zhou, M., & Robinson, C. V. (2010). When proteomics meets structural biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(9), 522–529. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2010.04.007>
- Zuccala, E. S., Gout, A. M., Dekiwadia, C., Marapana, D. S., Angrisano, F., Turnbull, L., Riglar, D. T., Rogers, K. L., Whitchurch, C. B., Ralph, S. A., Speed, T. P., & Baum, J. (2012). Subcompartmentalisation of Proteins in the Rhoptries Correlates with Ordered Events of Erythrocyte Invasion by the Blood Stage Malaria Parasite. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0046160>,

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Proteínas humanas da fração membranas

Proteína	Descrição	Pep Totais	Pep U	Cobertura	Comprimento
Q00013	55 kDa erythrocyte membrane protein	5-11-13	5-11-13	09%-25%-34%	466
P02768	Albumin	20-22-6	20-22-6	29%-32%-11%	609
P37840	Alpha-synuclein	10-10-10	10-10-10	54%-54%-54%	140
P16157	Ankyrin-1	20-76-90	20-76-90	14%-44%-50%	1881
P02730	Band 3 anion transport protein	12-34-35	12-34-35	14%-31%-29%	911
P35612	Beta-adducin	2-13-15	2-13-15	02%-23%-25%	726
P07738	Bisphosphoglycerate mutase	6-7-7	6-7-7	27%-36%-36%	259
Q9H3K6	BolA-like protein 2	2-3-3	2-3-3	29%-37%-37%	86
P00915	Carbonic anhydrase 1	9-17-14	9-17-14	48%-66%-67%	261
P00918	Carbonic anhydrase 2	4-8-8	4-8-8	18%-36%-36%	260
P04040	Catalase	16-24-21	16-24-21	28%-39%-37%	527
Q08495	Dematin	5-18-19	5-18-19	12%-43%-49%	405
Q5XPI4	E3 ubiquitin-protein ligase RNF123	6-9-16	6-9-16	05%-08%-11%	1314
P02679	Fibrinogen gamma chain	11-15-4	11-15-4	20%-32%-10%	453
P30043	Flavin reductase (NADPH)	3-9-10	3-9-10	20%-45%-49%	206
P69905	Hemoglobin subunit alpha	14-25-19	13-24-18	75%-77%-80%	142
P68871	Hemoglobin subunit beta	14-20-20	6-9-10	76%-76%-80%	147
P02042	Hemoglobin subunit delta	11-18-17	3-7-7	63%-85%-90%	147
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2	4-6-5	3-5-4	34%-48%-39%	147
P02008	Hemoglobin subunit zeta	2-2-4	1-1-3	12%-16%-30%	142
P32119	Peroxiredoxin-2	10-12-13	10-12-13	33%-42%-44%	198
P08397	Porphobilinogen deaminase	3-2-4	3-2-4	07%-05%-10%	361
P11171	Protein 4,1	8-39-46	8-39-46	13%-39%-46%	864
P16452	Protein 4,2	5-27-30	5-27-30	08%-30%-33%	691
Q5TDH0	Protein DDI1 homolog 2	9-9-11	9-9-11	27%-28%-35%	399

P26447	Protein S100-A4	2-3-5	2-3-5	09%-18%-36%	101
P30613	Pyruvate kinase PKLR	6-12-15	6-12-15	11%-26%-33%	574
P02549	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	47-154-183	47-154-183	22%-53%-55%	2419
P11277	Spectrin beta chain, erythrocytic	38-136-157	38-136-157	20%-60%-63%	2137
Q5VVQ6	Ubiquitin thioesterase OTU1	2-5-11	2-5-11	06%-16%-27%	348
Q9BSL1	Ubiquitin-associated domain-containing protein 1	2-3-4	2-3-4	04%-10%-12%	405

Anexo 2. Proteínas humanas da fração citoplasmática

Proteína	Descrição	Pep Totais	Pep U	Cobertura	Comprimento
P02768	Albumin	16-13-16	16-13-16	25%-23%-24%	609
P37840	Alpha-synuclein	4-6-6	4-6-6	31%-46%-45%	140
P16157	Ankyrin-1	18-8-15	18-8-15	12%-06%-09%	1881
P02730	Band 3 anion transport protein	5-4-4	5-4-4	06%-07%-07%	911
P07738	Bisphosphoglycerate mutase	6-5-7	6-5-7	32%-23%-35%	259
P00915	Carbonic anhydrase 1	17-20-19	17-20-19	74%-76%-70%	261
P00918	Carbonic anhydrase 2	13-12-11	13-12-11	52%-57%-57%	260
P07451	Carbonic anhydrase 3	2-5-2	2-5-2	17%-27%-14%	260
P04040	Catalase	20-21-21	20-21-21	38%-36%-41%	527
P30043	Flavin reductase (NADPH)	7-10-9	7-10-9	40%-45%-45%	206
P69905	Hemoglobin subunit alpha	29-31-29	28-30-28	99%-99%-99%	142
P68871	Hemoglobin subunit beta	23-28-27	13-17-17	87%-88%-89%	147
P02042	Hemoglobin subunit delta	16-19-18	6-8-8	79%-85%-87%	147
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2	8-9-8	7-8-7	52%-68%-60%	147
P02008	Hemoglobin subunit zeta	2-4-3	1-3-2	12%-30%-19%	142
Q13228	Methanethiol oxidase	13-14-14	13-14-14	34%-33%-34%	472
P32119	Peroxiredoxin-2	13-12-13	13-12-13	41%-38%-41%	198
P11171	Protein 4,1	9-4-7	9-4-7	13%-08%-11%	864
P00491	Purine nucleoside phosphorylase	4-6-3	4-6-3	21%-33%-14%	289
P02549	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	23-9-20	23-9-20	11%-05%-10%	2419
P11277	Spectrin beta chain, erythrocytic	20-12-18	20-12-18	11%-06%-10%	2137
Q13404	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	2-2-2	2-2-2	11%-12%-11%	147

Anexo 3. Proteínas humanas da fração parasitaria

Proteína	Descrição	Pep Totais	Pep U	Cobertura	Comprimento
Q00013	55 kDa erythrocyte membrane protein	4-5-3	4-5-3	09%-14%-08%	466
P02768	Albumin	10-9-2	10-9-2	16%-16%-04%	609
P01009	Alpha-1-antitrypsin	15-12-2	15-12-2	39%-36%-05%	418
P37840	Alpha-synuclein	7-7-8	7-7-8	45%-46%-46%	140
P16157	Ankyrin-1	57-39-59	57-39-59	41%-28%-39%	1881
P02647	Apolipoprotein A-I	14-17-3	14-17-3	50%-60%-15%	267
P02730	Band 3 anion transport protein	16-12-17	16-12-17	22%-18%-22%	911
P35612	Beta-adducin	6-3-9	6-3-9	11%-05%-17%	726
P07738	Bisphosphoglycerate mutase	4-6-5	4-6-5	20%-31%-22%	259
P00915	Carbonic anhydrase 1	19-17-19	19-17-19	75%-69%-75%	261
P00918	Carbonic anhydrase 2	13-8-12	13-8-12	52%-39%-52%	260
P04040	Catalase	26-16-23	26-16-23	41%-29%-41%	527
P01024	Complement C3	46-36-5	46-36-5	30%-23%-04%	1663
Q08495	Dematin	12-6-15	12-6-15	35%-18%-37%	405
P02671	Fibrinogen alpha chain	27-17-7	27-17-7	39%-32%-09%	866
P02675	Fibrinogen beta chain	15-12-3	15-12-3	25%-21%-08%	491
P02679	Fibrinogen gamma chain	13-12-9	13-12-9	36%-29%-25%	453
P30043	Flavin reductase (NADPH)	9-7-8	9-7-8	45%-45%-40%	206
P69905	Hemoglobin subunit alpha	27-24-27	26-23-26	80%-80%-99%	142
P68871	Hemoglobin subunit beta	25-26-23	14-17-12	87%-95%-87%	147
P02042	Hemoglobin subunit delta	18-15-19	7-6-8	87%-76%-88%	147
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2	8-7-8	7-6-7	59%-60%-60%	147
Q16775	Hydroxyacylglutathione hydrolase	2-2-3	2-2-3	09%-09%-12%	308
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	19-18-4	19-18-4	24%-25%-06%	946
Q13228	Methanethiol oxidase	18-13-15	18-13-15	43%-32%-37%	472
P32119	Peroxiredoxin-2	11-12-13	11-12-13	41%-42%-42%	198
P11171	Protein 4,1	20-17-20	20-17-20	24%-20%-27%	864
P16452	Protein 4,2	14-9-9	14-9-9	21%-17%-15%	691

P00491	Purine nucleoside phosphorylase	6-7-4	6-7-4	29%-31%-16%	289
P02549	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	82-52-58	82-52-58	31%-25%-26%	2419
P11277	Spectrin beta chain, erythrocytic	71-54-50	71-54-50	35%-30%-29%	2137
P27105	Stomatin	5-3-5	5-3-5	17%-12%-20%	288
P28289	Tropomodulin-1	3-4-5	3-4-5	12%-21%-20%	359

Anexo 4. Proteínas do *P. falciparum* na fração membranas

Proteína	Descrição	Pep Totais	Pep U	Cobertura	Comprimento
PF3D7_0818200	14-3-3 protein I	6-6-7	6-6-7	23%-30%-30%	262
PF3D7_0802200	1-cys peroxiredoxin	4-2-3	4-2-3	20%-09%-16%	220
PF3D7_1008400	26S protease regulatory subunit 4, putative	2-3-3	2-3-3	04%-12%-09%	448
PF3D7_1130400	26S protease regulatory subunit 6A, putative	6-6-6	6-6-6	16%-18%-18%	439
PF3D7_0413600	26S protease regulatory subunit 6B, putative	2-8-6	2-8-6	03%-26%-17%	392
PF3D7_1311500	26S protease regulatory subunit 7, putative	2-5-2	2-4-2	04%-12%-04%	420
PF3D7_0205900	26S proteasome regulatory subunit RPN1, putative	5-4-2	5-4-2	07%-06%-04%	966
PF3D7_1368100	26S proteasome regulatory subunit RPN11, putative	6-4-2	6-4-2	20%-14%-06%	311
PF3D7_1466300	26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative	3-4-4	3-4-4	03%-04%-03%	1172
PF3D7_1338100	26S proteasome regulatory subunit RPN3, putative	2-2-2	2-2-2	04%-06%-06%	503
PF3D7_1129200	26S proteasome regulatory subunit RPN7, putative	3-2-2	3-2-2	10%-05%-05%	393
PF3D7_0719700	40S ribosomal protein S10, putative	2-6-3	2-6-3	08%-37%-19%	137
PF3D7_0516200	40S ribosomal protein S11	7-8-8	7-8-8	31%-52%-39%	151
PF3D7_0317600	40S ribosomal protein S11, putative	4-5-5	4-5-5	22%-24%-22%	161
PF3D7_1358800	40S ribosomal protein S15	9-7-6	9-7-6	32%-31%-26%	151
PF3D7_0316800	40S ribosomal protein S15A, putative	2-6-8	2-6-8	14%-47%-55%	130
PF3D7_0813900	40S ribosomal protein S16, putative	5-8-4	5-8-4	28%-44%-23%	144
PF3D7_1242700	40S ribosomal protein S17, putative	4-8-5	4-8-5	23%-50%-34%	137
PF3D7_1126200	40S ribosomal protein S18, putative	4-6-5	4-6-5	18%-44%-29%	156
PF3D7_0422400	40S ribosomal protein S19	5-8-7	5-8-7	22%-41%-40%	170
PF3D7_1003500	40S ribosomal protein S20e, putative	2-3-2	2-3-2	15%-13%-11%	118
PF3D7_1144000	40S ribosomal protein S21	3-2-2	3-2-2	33%-24%-24%	82
PF3D7_1421200	40S ribosomal protein S25	5-8-6	5-8-6	41%-50%-48%	105
PF3D7_1461300	40S ribosomal protein S28e, putative	2-3-2	2-3-2	42%-46%-28%	67
PF3D7_1465900	40S ribosomal protein S3	5-10-7	5-10-7	19%-35%-29%	221
PF3D7_0322900	40S ribosomal protein S3a	10-13-9	10-13-9	38%-43%-26%	262
PF3D7_1105400	40S ribosomal protein S4	7-10-6	7-10-6	26%-40%-23%	261
PF3D7_1447000	40S ribosomal protein S5	2-7-4	2-7-4	04%-18%-14%	272

PF3D7_0721600	40S ribosomal protein S5, putative	4-4-5	4-4-5	10%-10%-10%	195
PF3D7_1342000	40S ribosomal protein S6	11-7-8	11-7-8	20%-23%-20%	306
PF3D7_1302800	40S ribosomal protein S7	4-5-5	4-5-5	15%-20%-15%	194
PF3D7_1408600	40S ribosomal protein S8	3-8-5	3-8-5	18%-33%-26%	218
PF3D7_0520000	40S ribosomal protein S9, putative	2-9-5	2-9-5	09%-39%-21%	189
PF3D7_1026800	40S ribosomal protein SA	5-5-2	5-5-2	17%-24%-13%	263
PF3D7_1130200	60S acidic ribosomal protein P0	6-8-8	6-8-8	22%-31%-31%	316
PF3D7_0309600	60S acidic ribosomal protein P2	2-4-2	2-4-2	22%-26%-22%	112
PF3D7_1441200	60S ribosomal protein L1, putative	3-3-2	3-3-2	09%-13%-12%	217
PF3D7_0517000	60S ribosomal protein L12, putative	4-5-3	4-5-3	28%-33%-19%	165
PF3D7_1004000	60S ribosomal protein L13, putative	8-6-4	8-6-4	29%-20%-16%	202
PF3D7_1431700	60S ribosomal protein L14, putative	6-4-4	6-4-4	30%-20%-19%	165
PF3D7_1351400	60S ribosomal protein L17, putative	4-3-2	4-3-2	15%-12%-08%	203
PF3D7_1341200	60S ribosomal protein L18a	4-8-4	4-8-4	23%-39%-24%	184
PF3D7_0516900	60S ribosomal protein L2	7-7-4	7-7-4	20%-30%-15%	260
PF3D7_1426000	60S ribosomal protein L21	3-3-3	3-3-3	12%-12%-12%	161
PF3D7_1323400	60S ribosomal protein L23	3-2-2	3-2-2	13%-13%-13%	190
PF3D7_1309100	60S ribosomal protein L24, putative	3-4-4	3-4-4	11%-16%-16%	162
PF3D7_1460700	60S ribosomal protein L27	4-4-5	4-4-5	16%-22%-29%	146
PF3D7_0618300	60S ribosomal protein L27a, putative	6-7-4	6-7-4	24%-30%-23%	148
PF3D7_1142500	60S ribosomal protein L28	6-4-2	6-4-2	35%-28%-16%	127
PF3D7_1027800	60S ribosomal protein L3	11-13-9	11-13-9	22%-25%-15%	386
PF3D7_1142600	60S ribosomal protein L35ae, putative	2-3-2	2-3-2	06%-16%-15%	140
PF3D7_1130100	60S ribosomal protein L38	3-5-2	3-5-2	23%-37%-13%	87
PF3D7_0507100	60S ribosomal protein L4	8-8-9	8-8-9	20%-20%-24%	411
PF3D7_1424100	60S ribosomal protein L5, putative	7-4-4	7-4-4	22%-12%-13%	294
PF3D7_1323100	60S ribosomal protein L6, putative	4-4-2	4-4-2	22%-27%-09%	190
PF3D7_1338200	60S ribosomal protein L6, putative	3-4-5	3-4-5	12%-24%-24%	221
PF3D7_0307200	60S ribosomal protein L7, putative	5-10-4	5-10-4	14%-32%-21%	257
PF3D7_1424400	60S ribosomal protein L7a	6-3-4	6-3-4	13%-12%-16%	283
PF3D7_1427900	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32	3-7-2	3-7-2	12%-31%-09%	281

PF3D7_1246200	Actin-1	13-21-15	13-19-13	31%-60%-41%	376
PF3D7_1412500	Actin-2	3-6-4	3-4-2	10%-30%-15%	376
PF3D7_1238800	Acyl-CoA synthetase	6-11-6	6-11-6	06%-18%-09%	792
PF3D7_1029600	Adenosine deaminase	2-4-4	2-4-4	05%-13%-13%	367
PF3D7_0520900	Adenosylhomocysteinase	8-9-8	8-9-8	15%-18%-14%	479
PF3D7_1020900	ADP-ribosylation factor 1	4-6-5	4-6-5	30%-44%-36%	181
PF3D7_1149000	Antigen 332, DBL-like protein	2-19-22	1-17-20	01%-05%-05%	6093
PF3D7_1133400	Apical membrane antigen 1	2-11-6	2-11-6	03%-23%-11%	622
PF3D7_0414900	Armadillo-domain containing rhoptry protein	3-5-3	3-5-3	12%-23%-16%	275
PF3D7_0211800	Asparagine--tRNA ligase	3-4-2	3-4-2	05%-09%-04%	610
PF3D7_0810600	ATP-dependent RNA helicase DBP1, putative	8-5-6	7-4-5	08%-07%-09%	941
PF3D7_1445900	ATP-dependent RNA helicase DDX5, putative	7-2-6	7-2-6	16%-05%-10%	527
PF3D7_0209800	ATP-dependent RNA helicase UAP56	4-4-7	4-4-7	07%-11%-12%	457
PF3D7_1445700	Btz domain-containing protein	8-2-4	8-2-4	20%-07%-12%	351
PF3D7_0217500	Calcium-dependent protein kinase 1	2-6-2	2-6-2	04%-13%-04%	524
PF3D7_1238100	Calcyclin-binding protein	3-4-3	3-4-3	11%-21%-18%	228
PF3D7_1434200	Calmodulin	2-3-2	2-3-2	22%-32%-22%	149
PF3D7_0934800	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit	6-5-7	6-5-7	15%-14%-20%	342
PF3D7_1223100	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit	4-8-9	4-8-9	08%-16%-17%	441
PF3D7_1136500	Casein kinase I	4-11-5	4-11-5	11%-29%-15%	324
PF3D7_0306800	CCT-beta	9-11-8	9-11-8	18%-24%-17%	533
PF3D7_0619400	Cell division cycle protein 48 homologue, putative	7-7-7	7-7-7	08%-07%-09%	828
PF3D7_1334200	Chaperone binding protein, putative	4-2-2	4-2-2	08%-03%-04%	524
PF3D7_1219100	Clathrin heavy chain	3-16-5	3-16-5	02%-10%-03%	1997
PF3D7_1236100	Clustered-asparagine-rich protein	2-3-5	2-3-5	05%-10%-15%	445
PF3D7_0606700	Coatomer alpha subunit, putative	11-5-4	11-5-4	09%-04%-03%	1512
PF3D7_1127600	CRAL/TRIO domain-containing protein, putative	6-4-5	6-4-5	20%-11%-18%	297
PF3D7_1409800	CUGBP Elav-like family member 2, putative	5-2-2	5-2-2	12%-05%-06%	514
PF3D7_0935800	Cytoadherence linked asexual protein 9	2-7-7	2-7-7	01%-05%-05%	1340
PF3D7_0814200	DNA/RNA-binding protein Alba 1	3-5-5	3-5-5	12%-16%-16%	248
PF3D7_1006200	DNA/RNA-binding protein Alba 3	2-7-4	2-7-4	16%-65%-48%	107

PF3D7_1347500	DNA/RNA-binding protein Alba 4	5-11-8	5-11-8	15%-28%-23%	372
PF3D7_0806500	DnaJ protein, putative	2-2-3	2-2-3	03%-04%-05%	675
PF3D7_1473200	DnaJ protein, putative	3-2-2	3-2-2	06%-06%-05%	454
PF3D7_1145400	Dynamin-like protein	7-7-5	7-6-4	09%-08%-05%	837
PF3D7_1033200	Early transcribed membrane protein 10.2	4-15-14	4-15-14	10%-44%-39%	355
PF3D7_0532100	Early transcribed membrane protein 5	3-6-6	3-6-6	21%-24%-24%	181
PF3D7_1419700	eIF3h_C domain-containing protein	3-4-2	3-4-2	08%-10%-06%	509
PF3D7_1357000	Elongation factor 1-alpha	24-32-31	24-32-31	58%-64%-61%	443
PF3D7_0913200	Elongation factor 1-beta	6-6-4	6-6-4	21%-18%-14%	276
PF3D7_1338300	Elongation factor 1-gamma, putative	5-6-4	5-6-4	12%-12%-08%	411
PF3D7_1451100	Elongation factor 2	13-11-10	13-11-10	16%-18%-13%	832
PF3D7_0731100	EMP1-trafficking protein	3-2-9	3-2-9	04%-03%-15%	890
PF3D7_1108600	Endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein	3-21-6	3-21-6	09%-55%-20%	343
PF3D7_1222300	Endoplasmin, putative	8-29-10	8-29-10	11%-37%-14%	821
PF3D7_1015900	Enolase	6-11-6	6-11-6	15%-26%-17%	446
PF3D7_0201900	Erythrocyte membrane protein 3	5-6-7	1-1-2	27%-28%-32%	2441
PF3D7_1036900	Erythrocyte membrane protein pfemp3	8-4-6	8-4-6	08%-04%-06%	1681
PF3D7_0703500	Erythrocyte membrane-associated antigen	15-10-8	15-10-8	06%-06%-04%	2299
PF3D7_1124600	Ethanolamine kinase	14-12-11	14-12-11	24%-24%-22%	423
PF3D7_0728000	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha	2-3-3	2-3-3	06%-12%-06%	329
PF3D7_1212700	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	15-17-11	15-17-11	09%-13%-09%	1377
PF3D7_0517700	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	14-19-6	14-19-6	14%-32%-08%	716
PF3D7_1206200	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	13-13-5	13-13-5	11%-11%-06%	984
PF3D7_1007900	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	7-12-7	7-12-7	15%-23%-14%	543
PF3D7_0528200	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	4-5-2	4-5-2	07%-09%-04%	517
PF3D7_0815600	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	4-6-3	4-6-3	18%-32%-16%	268
PF3D7_0716800	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	4-11-5	4-11-5	19%-43%-23%	327
PF3D7_0612100	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	4-7-2	4-7-2	04%-11%-03%	656
PF3D7_0418200	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	8-7-4	8-7-4	15%-17%-10%	429
PF3D7_0315100	Eukaryotic translation initiation factor 4E	2-6-4	2-6-4	08%-27%-18%	227

PF3D7_0730800	Exported protein	4-5-6	4-5-6	19%-22%-27%	293
PF3D7_1121600	Exported protein 1	4-9-7	4-9-7	07%-50%-49%	162
PF3D7_1471100	Exported protein 2	2-10-9	2-10-9	07%-34%-31%	287
PF3D7_0910100	Exportin-7, putative	6-4-6	6-4-6	05%-03%-05%	1198
PF3D7_1444800	Fructose-bisphosphate aldolase	10-17-15	10-17-15	25%-37%-37%	369
PF3D7_1302100	Gamete antigen 27/25	10-7-9	10-7-9	44%-35%-42%	217
PF3D7_1035300	Glutamate-rich protein GLURP	2-17-18	1-12-14	03%-33%-31%	1233
PF3D7_1462800	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9-14-9	9-14-9	25%-39%-26%	337
PF3D7_1016300	Glycophorin-binding protein 130	17-19-32	4-5-13	69%-74%-78%	824
PF3D7_1117700	GTP-binding nuclear protein	13-12-11	13-12-11	50%-56%-44%	214
PF3D7_1456800	H(+)-exporting diphosphatase	2-12-11	2-12-11	03%-15%-15%	717
PF3D7_0708800	Heat shock protein 110	3-8-5	3-8-5	04%-11%-06%	873
PF3D7_0818900	Heat shock protein 70	22-28-23	17-23-18	29%-35%-34%	677
PF3D7_0831700	Heat shock protein 70	12-13-18	7-8-13	19%-23%-25%	679
PF3D7_0917900	Heat shock protein 70	7-31-19	7-31-19	12%-43%-29%	652
PF3D7_0708400	Heat shock protein 90	27-31-30	27-31-30	30%-36%-38%	745
PF3D7_1211400	Heat shock protein DNAJ homologue Pfj4	3-8-7	3-8-7	14%-29%-29%	244
PF3D7_0817900	High mobility group protein B2	2-2-2	2-2-2	23%-28%-28%	99
PF3D7_0929400	High molecular weight rhoptry protein 2	10-36-28	10-36-28	08%-24%-21%	1378
PF3D7_0905400	High molecular weight rhoptry protein 3	8-19-10	8-19-10	08%-25%-14%	897
PF3D7_0617800	Histone H2A	2-2-2	1-1-1	12%-12%-12%	132
PF3D7_0320900	Histone H2A	5-6-5	4-5-4	31%-34%-31%	158
PF3D7_0714000	Histone H2B	3-6-5	3-6-5	23%-33%-32%	123
PF3D7_1105100	Histone H2B	4-6-5	4-6-5	27%-40%-27%	117
PF3D7_0610400	Histone H3	10-10-8	5-4-3	34%-35%-26%	136
PF3D7_0617900	Histone H3	8-10-9	3-4-4	26%-35%-34%	136
PF3D7_1105000	Histone H4	5-14-9	5-14-9	27%-65%-51%	103
PF3D7_1437900	HSP40, subfamily A	12-8-10	12-8-10	17%-13%-17%	424
PF3D7_1434300	Hsp70-Hsp90 organising protein	9-5-6	9-5-6	15%-09%-09%	564
PF3D7_1453700	HSP90 co-chaperone p23	2-4-3	2-4-3	05%-24%-08%	275
PF3D7_0812400	Importin subunit alpha	7-8-6	7-8-6	11%-13%-12%	545

PF3D7_0706000	Importin-7, putative	3-4-7	3-4-7	02%-03%-06%	1229
PF3D7_0920800	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	2-3-2	2-3-2	05%-09%-05%	510
PF3D7_0511800	Inositol-3-phosphate synthase 1	3-9-8	3-9-8	05%-18%-15%	604
PF3D7_0524000	Karyopherin beta	10-15-16	10-15-16	11%-17%-18%	1123
PF3D7_0201800	Knob associated heat shock protein 40	6-2-6	6-2-6	13%-07%-14%	421
PF3D7_0202000	Knob-associated histidine-rich protein	4-9-8	4-9-8	06%-13%-12%	654
PF3D7_0108300	Leucine-rich repeat protein	2-4-4	2-4-4	01%-02%-02%	2221
PF3D7_1324900	L-lactate dehydrogenase	6-9-7	6-9-7	17%-22%-22%	316
PF3D7_0525100	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	6-6-7	6-6-7	07%-13%-11%	673
PF3D7_1446200	M17 leucyl aminopeptidase	4-4-4	4-4-4	07%-08%-08%	605
PF3D7_1311800	M1-family alanyl aminopeptidase	2-14-11	2-14-11	02%-15%-13%	-
PF3D7_1457300	MA3 domain-containing protein, putative	3-2-2	3-2-2	04%-03%-04%	639
PF3D7_1229400	Macrophage migration inhibitory factor	2-3-2	2-3-2	16%-24%-18%	116
PF3D7_1115800	Mago-bind domain-containing protein	3-2-4	3-2-4	13%-05%-13%	304
PF3D7_0500800	Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen	9-31-39	7-26-32	09%-30%-32%	1434
PF3D7_0930300	Merozoite surface protein 1	13-53-52	13-53-51	09%-31%-30%	1720
PF3D7_1228600	Merozoite surface protein 9	5-8-9	5-8-9	08%-18%-19%	743
PF3D7_1034900	Methionine--tRNA ligase	2-7-5	2-7-5	02%-11%-06%	889
PF3D7_1128200	Multiprotein-bridging factor 1, putative	11-3-6	11-3-6	57%-15%-29%	136
PF3D7_1342600	Myosin-A	2-6-7	2-6-7	02%-07%-08%	818
PF3D7_1426100	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	4-2-2	4-2-2	30%-11%-11%	171
PF3D7_1202600	NFACT-R_1 domain-containing protein	5-2-2	5-2-2	02%-01%-01%	2180
PF3D7_0813300	NPL domain-containing protein	2-5-5	2-5-5	07%-15%-18%	315
PF3D7_1423700	NTF2 domain-containing protein	4-4-3	4-4-3	03%-03%-02%	1558
PF3D7_0919000	Nucleosome assembly protein	4-6-5	4-6-5	12%-19%-15%	269
PF3D7_1203700	Nucleosome assembly protein	3-4-2	3-4-2	06%-07%-03%	347
PF3D7_0722400	Obg-like ATPase 1	5-5-5	5-5-5	16%-16%-17%	393
PF3D7_0608800	Ornithine aminotransferase	3-9-9	3-9-9	08%-21%-18%	414
PF3D7_0925900	Parasitophorous vacuolar protein 5, putative	5-2-4	5-2-4	18%-07%-18%	217
PF3D7_1343000	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	7-11-12	7-11-12	26%-39%-43%	266
PF3D7_0922500	Phosphoglycerate kinase	6-18-13	6-18-13	20%-45%-38%	416

PF3D7_1408100	Plasmepsin III	4-11-4	4-11-4	10%-25%-12%	451
PF3D7_1224300	Polyadenylate-binding protein	16-15-13	16-15-13	21%-20%-17%	875
PF3D7_0923900	Polyadenylate-binding protein 2, putative	3-2-2	3-2-2	12%-09%-09%	202
PF3D7_1107300	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1	11-4-3	11-4-3	04%-02%-02%	3334
PF3D7_1011800	PRE-binding protein	20-19-9	20-19-9	18%-16%-09%	1139
PF3D7_1201000	PRESAN domain-containing protein	6-8-12	6-8-12	10%-12%-17%	653
PF3D7_0801000	PRESAN domain-containing protein	9-16-25	8-15-24	13%-19%-25%	1219
PF3D7_0532300	PRESAN domain-containing protein	8-3-6	8-3-6	17%-09%-16%	509
PF3D7_0424600	PRESAN domain-containing protein	2-7-8	2-7-8	06%-22%-24%	309
PF3D7_0731300	PRESAN domain-containing protein	2-3-7	2-3-7	05%-14%-21%	317
PF3D7_0401800	PRESAN domain-containing protein	6-10-10	6-10-10	11%-17%-17%	560
PF3D7_0402000	PRESAN domain-containing protein	4-4-7	4-4-7	03%-12%-15%	428
PF3D7_0915400	Probable ATP-dependent 6-phosphofructokinase	11-10-10	11-10-10	09%-11%-11%	1418
PF3D7_1428300	Proliferation-associated protein 2g4, putative	4-5-6	4-5-6	11%-14%-15%	377
PF3D7_0727400	Proteasome subunit alpha type	3-5-4	3-5-4	12%-23%-21%	256
PF3D7_1353900	Proteasome subunit alpha type	3-4-2	3-4-2	13%-19%-09%	241
PF3D7_1474800	Proteasome subunit alpha type-1, putative	2-5-3	2-5-3	11%-28%-18%	254
PF3D7_0827900	Protein disulfide-isomerase	4-18-8	4-18-8	08%-33%-17%	483
PF3D7_0627500	Protein DJ-1	3-5-3	3-5-3	13%-26%-17%	189
PF3D7_1138500	Protein phosphatase PPM2	6-4-9	6-4-9	07%-05%-12%	924
PF3D7_0213100	Protein SIS1	6-8-7	5-8-7	17%-25%-24%	328
PF3D7_1410600	Protein-synthesizing GTPase	5-5-4	5-5-4	14%-17%-13%	465
PF3D7_0621200	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit Pdx1	3-4-3	3-4-3	09%-18%-09%	301
PF3D7_0626800	Pyruvate kinase	7-10-9	7-10-9	14%-24%-23%	511
PF3D7_1320600	Ras-related protein Rab-11A	2-9-5	1-8-4	10%-46%-25%	216
PF3D7_0807300	Ras-related protein Rab-18	2-4-4	2-4-4	11%-18%-23%	201
PF3D7_0512600	Ras-related protein Rab-1B	2-7-4	2-7-4	09%-40%-24%	200
PF3D7_1144900	Ras-related protein Rab-6	2-6-7	2-6-6	12%-31%-35%	207
PF3D7_1252100	Rhoptry neck protein 3	3-30-26	3-30-26	01%-15%-12%	2215
PF3D7_1410400	Rhoptry-associated protein 1	6-33-22	6-33-22	09%-40%-25%	782
PF3D7_0501600	Rhoptry-associated protein 2	2-11-9	2-11-9	05%-30%-27%	398

PF3D7_1437200	Ribonucleoside-diphosphate reductase	5-4-4	5-4-4	06%-06%-06%	847
PF3D7_0415900	Ribosomal protein L15	4-5-4	4-5-4	22%-25%-22%	205
PF3D7_0524400	Ribosome-interacting GTPase 1, putative	3-2-4	3-2-4	10%-06%-12%	365
PF3D7_0935900	Ring-exported protein 1	5-14-25	4-14-22	14%-20%-46%	713
PF3D7_0936300	Ring-exported protein 3	2-3-2	2-3-2	09%-13%-11%	326
PF3D7_0102200	Ring-infected erythrocyte surface antigen	5-11-17	3-7-12	05%-12%-15%	1085
PF3D7_1149200	Ring-infected erythrocyte surface antigen	6-9-13	4-5-8	06%-07%-11%	1090
PF3D7_1468700	RNA helicase	7-9-7	7-9-7	18%-24%-19%	398
PF3D7_0916700	RNA-binding protein musashi, putative	4-5-5	4-5-5	10%-14%-13%	388
PF3D7_1110400	RNA-binding protein, putative	8-7-3	8-7-3	05%-04%-02%	1483
PF3D7_0823200	RNA-binding protein, putative	2-4-2	2-4-2	10%-24%-10%	286
PF3D7_1362200	RuvB-like helicase	5-3-3	5-3-3	11%-07%-06%	483
PF3D7_0922200	S-adenosylmethionine synthase	11-12-10	11-12-10	29%-32%-26%	402
PF3D7_0912500	SAP domain-containing protein, putative	3-3-8	3-3-8	08%-16%-27%	288
PF3D7_1235600	Serine hydroxymethyltransferase	2-5-3	2-5-3	04%-13%-06%	442
PF3D7_1022400	Serine/arginine-rich splicing factor 4	3-3-2	3-3-2	05%-06%-03%	538
PF3D7_0207600	Serine-repeat antigen protein 5	15-23-20	15-22-18	16%-25%-21%	997
PF3D7_1006800	Single-strand telomeric DNA-binding protein GBP2	3-4-4	3-4-4	07%-12%-12%	246
PF3D7_0702400	Small exported membrane protein 1	6-5-8	6-5-8	45%-33%-45%	123
PF3D7_0416800	Small GTP-binding protein sar1	5-11-9	5-11-9	34%-58%-45%	192
PF3D7_1324700	SNARE protein, putative	4-3-5	4-3-5	16%-14%-24%	221
PF3D7_1451800	Sortilin	2-7-2	2-7-2	03%-09%-02%	895
PF3D7_1132200	T-complex protein 1 subunit alpha	5-5-3	5-5-3	10%-11%-06%	544
PF3D7_1357800	T-complex protein 1 subunit delta	5-3-3	5-3-3	11%-07%-07%	529
PF3D7_0320300	T-complex protein 1 subunit epsilon	6-3-4	6-3-4	11%-05%-08%	535
PF3D7_0308200	T-complex protein 1 subunit eta	4-4-2	4-4-2	08%-09%-05%	539
PF3D7_1229500	T-complex protein 1 subunit gamma	10-7-8	10-7-8	16%-11%-13%	542
PF3D7_0214000	T-complex protein 1 subunit theta	6-3-2	6-3-2	11%-08%-06%	542
PF3D7_0608700	T-complex protein 1 subunit zeta	3-5-4	3-5-4	07%-11%-09%	543
PF3D7_1438900	Thioredoxin peroxidase 1	2-5-5	2-5-5	08%-38%-31%	195
PF3D7_1126000	Threonine--tRNA ligase	4-4-4	4-4-4	04%-04%-04%	1013

PF3D7_1123400	Translation elongation factor EF-1, subunit alpha, putative	4-4-2	4-4-2	07%-08%-04%	555
PF3D7_0607000	Translation initiation factor IF-2, putative	5-5-2	5-5-2	05%-07%-03%	977
PF3D7_1243600	Translation initiation factor SUI1, putative	2-2-2	2-2-2	17%-17%-17%	115
PF3D7_0627700	Transportin	3-6-3	3-6-3	03%-06%-03%	1147
PF3D7_1442300	tRNA import protein tRIP	3-3-3	3-3-3	06%-07%-07%	402
PF3D7_1136300	Tudor staphylococcal nuclease	13-5-5	13-5-5	11%-06%-04%	1098
PF3D7_1135400	Uncharacterized protein	3-8-11	3-8-11	14%-30%-46%	245
PF3D7_0821400	Uncharacterized protein	3-4-3	3-4-3	18%-30%-18%	124
PF3D7_0702500	Uncharacterized protein	4-7-9	4-7-9	15%-34%-39%	253
PF3D7_1366900	Uncharacterized protein MAL13P1.336	4-4-4	4-4-4	06%-08%-05%	685
PF3D7_1120000	Uncharacterized protein PF3D7_1120000	16-4-10	11-3-5	29%-14%-22%	1070
PF3D7_0406100	Vacuolar proton pump subunit B	4-5-5	4-5-5	12%-16%-14%	494
PF3D7_0617200	Viral a-type inclusion protein	9-6-3	9-6-3	19%-15%-07%	446
PF3D7_1311900	V-type proton ATPase catalytic subunit A	3-6-4	3-6-4	05%-11%-08%	611
PF3D7_1341900	V-type proton ATPase subunit D, putative	3-3-3	3-3-3	12%-13%-13%	247
PF3D7_1323200	V-type proton ATPase subunit G, putative	2-4-2	2-4-2	18%-34%-18%	123

Anexo 5. Proteínas do *P. falciparum* na fração citoplasmática

Proteína	Descrição	Pep Totais	Pep U	Cobertura	Comprimento
PF3D7_1246200	Actin-1	2-7-3	1-6-2	07%-16%-10%	376
PF3D7_1029600	Adenosine deaminase	2-3-3	2-3-3	07%-10%-09%	367
PF3D7_1357000	Elongation factor 1-alpha	15-15-12	15-15-12	39%-39%-33%	443
PF3D7_1451100	Elongation factor 2	5-8-6	5-8-6	07%-10%-09%	832
PF3D7_1015900	Enolase	7-7-5	7-7-5	23%-21%-18%	446
PF3D7_1444800	Fructose-bisphosphate aldolase	11-12-11	11-12-11	33%-37%-34%	369
PF3D7_1462800	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9-10-8	9-10-8	23%-25%-26%	337
PF3D7_1016300	Glycophorin-binding protein 130	7-7-7	1-1-1	30%-43%-42%	824
PF3D7_1117700	GTP-binding nuclear protein	4-6-5	4-6-5	23%-34%-27%	214
PF3D7_0818900	Heat shock protein 70	8-10-8	6-8-7	14%-18%-16%	677
PF3D7_0831700	Heat shock protein 70	6-4-5	4-2-4	13%-07%-09%	679
PF3D7_0708400	Heat shock protein 90	8-14-10	8-14-10	13%-19%-14%	745
PF3D7_1012400	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	3-4-4	3-4-4	18%-22%-22%	231
PF3D7_0511800	Inositol-3-phosphate synthase 1	3-5-2	3-5-2	06%-09%-03%	604
PF3D7_0524000	Karyopherin beta	2-4-2	2-4-2	03%-05%-03%	1123
PF3D7_1324900	L-lactate dehydrogenase	7-9-8	7-9-8	22%-26%-22%	316
PF3D7_0608800	Ornithine aminotransferase	6-6-7	6-6-7	14%-11%-14%	414
PF3D7_1343000	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	5-9-7	5-9-7	24%-44%-29%	266
PF3D7_0922500	Phosphoglycerate kinase	11-16-12	11-16-12	31%-41%-37%	416
PF3D7_0932200	Profilin	2-2-3	2-2-3	18%-13%-18%	171
PF3D7_0627500	Protein DJ-1	2-2-3	2-2-3	12%-12%-13%	189
PF3D7_0626800	Pyruvate kinase	3-5-4	3-5-4	07%-14%-11%	511
PF3D7_0826700	Receptor for activated c kinase	2-4-4	2-4-4	09%-23%-15%	323
PF3D7_0922200	S-adenosylmethionine synthase	3-7-6	3-7-6	11%-20%-18%	402
PF3D7_0207600	Serine-repeat antigen protein 5	3-3-4	2-3-3	03%-03%-04%	997
PF3D7_1008700	Tubulin beta chain	2-3-2	2-3-2	05%-07%-05%	445

Anexo 6. Proteínas do *P. falciparum* na fração parasitaria

Proteína	Descrição	Pep Totais	Pep U	Cobertura	Comprimento
PF3D7_1215300	10 kDa chaperonin	7-2-7	7-2-7	60%-24%-60%	103
PF3D7_0818200	14-3-3 protein I	7-7-6	7-7-6	30%-31%-30%	262
PF3D7_0802200	1-cys peroxiredoxin	3-3-3	3-3-3	16%-18%-18%	220
PF3D7_1008400	26S protease regulatory subunit 4, putative	8-2-5	8-2-5	24%-07%-13%	448
PF3D7_1130400	26S protease regulatory subunit 6A, putative	9-3-11	9-3-11	12%-08%-21%	439
PF3D7_0413600	26S protease regulatory subunit 6B, putative	10-6-8	10-6-8	29%-17%-16%	392
PF3D7_1248900	26S protease regulatory subunit 8, putative	4-3-4	4-3-4	11%-07%-11%	435
PF3D7_0205900	26S proteasome regulatory subunit RPN1, putative	5-3-6	5-3-6	07%-05%-08%	966
PF3D7_1368100	26S proteasome regulatory subunit RPN11, putative	9-3-6	9-3-6	28%-06%-16%	311
PF3D7_1312600	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha	5-3-4	5-3-4	16%-10%-13%	429
PF3D7_0719700	40S ribosomal protein S10, putative	6-5-6	6-5-6	37%-37%-37%	137
PF3D7_0516200	40S ribosomal protein S11	9-6-9	9-6-9	57%-36%-57%	151
PF3D7_0317600	40S ribosomal protein S11, putative	3-2-2	3-2-2	12%-11%-11%	161
PF3D7_0307100	40S ribosomal protein S12	3-3-4	3-3-4	38%-38%-46%	141
PF3D7_1358800	40S ribosomal protein S15	10-4-7	10-4-7	52%-26%-34%	151
PF3D7_0316800	40S ribosomal protein S15A, putative	7-3-6	7-3-6	39%-25%-39%	130
PF3D7_0813900	40S ribosomal protein S16, putative	8-8-9	8-8-9	51%-41%-53%	144
PF3D7_1242700	40S ribosomal protein S17, putative	10-2-7	10-2-7	59%-14%-42%	137
PF3D7_1126200	40S ribosomal protein S18, putative	6-4-8	6-4-8	29%-19%-31%	156
PF3D7_0422400	40S ribosomal protein S19	8-6-8	8-6-8	41%-39%-38%	170
PF3D7_1144000	40S ribosomal protein S21	4-2-3	4-2-3	59%-24%-33%	82
PF3D7_1421200	40S ribosomal protein S25	8-5-7	8-5-7	50%-38%-50%	105
PF3D7_0217800	40S ribosomal protein S26	2-2-2	2-2-2	20%-20%-20%	107
PF3D7_1465900	40S ribosomal protein S3	7-4-9	7-4-9	37%-25%-40%	221
PF3D7_0322900	40S ribosomal protein S3a	10-7-5	10-7-5	35%-27%-21%	262
PF3D7_1105400	40S ribosomal protein S4	7-4-5	7-4-5	27%-18%-19%	261
PF3D7_1447000	40S ribosomal protein S5	7-4-7	7-4-7	23%-15%-20%	272
PF3D7_1342000	40S ribosomal protein S6	13-4-7	13-4-7	27%-17%-16%	306

PF3D7_1302800	40S ribosomal protein S7	4-3-5	4-3-5	15%-14%-20%	194
PF3D7_1408600	40S ribosomal protein S8	6-3-4	6-3-4	26%-19%-18%	218
PF3D7_0520000	40S ribosomal protein S9, putative	6-2-4	6-2-4	30%-09%-19%	189
PF3D7_1026800	40S ribosomal protein SA	8-5-9	8-5-9	33%-29%-40%	263
PF3D7_1232100	60 kDa chaperonin	9-6-7	9-6-7	13%-10%-10%	718
PF3D7_1130200	60S acidic ribosomal protein P0	9-8-9	9-8-9	35%-31%-35%	316
PF3D7_1103100	60S acidic ribosomal protein P1, putative	3-2-2	3-2-2	52%-43%-43%	118
PF3D7_0309600	60S acidic ribosomal protein P2	6-3-6	6-3-6	62%-23%-62%	112
PF3D7_1441200	60S ribosomal protein L1, putative	4-2-3	4-2-3	16%-12%-13%	217
PF3D7_0517000	60S ribosomal protein L12, putative	4-3-4	4-3-4	28%-22%-28%	165
PF3D7_1004000	60S ribosomal protein L13, putative	4-2-2	4-2-2	21%-09%-11%	202
PF3D7_1341200	60S ribosomal protein L18a	5-4-6	5-4-6	22%-15%-27%	184
PF3D7_1426000	60S ribosomal protein L21	4-2-4	4-2-4	12%-06%-12%	161
PF3D7_1460700	60S ribosomal protein L27	7-3-4	7-3-4	43%-22%-23%	146
PF3D7_0618300	60S ribosomal protein L27a, putative	7-5-4	7-5-4	39%-32%-28%	148
PF3D7_1142500	60S ribosomal protein L28	4-2-3	4-2-3	31%-16%-24%	127
PF3D7_1027800	60S ribosomal protein L3	9-4-6	9-4-6	17%-11%-13%	386
PF3D7_1142600	60S ribosomal protein L35ae, putative	4-2-4	4-2-4	20%-06%-16%	140
PF3D7_1109900	60S ribosomal protein L36	6-5-6	6-5-6	38%-37%-38%	112
PF3D7_0507100	60S ribosomal protein L4	12-3-9	12-3-9	29%-12%-25%	411
PF3D7_1424100	60S ribosomal protein L5, putative	8-4-4	8-4-4	23%-13%-14%	294
PF3D7_1323100	60S ribosomal protein L6, putative	5-3-5	5-3-5	28%-23%-31%	190
PF3D7_1338200	60S ribosomal protein L6, putative	6-4-4	6-4-4	31%-28%-11%	221
PF3D7_0404900	6-cysteine protein P41	2-2-3	2-2-3	07%-06%-10%	378
PF3D7_1454700	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	4-3-4	4-3-4	10%-08%-10%	468
PF3D7_0918000	Acid phosphatase	4-2-3	4-2-3	14%-09%-09%	396
PF3D7_1427900	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32	12-7-13	12-7-13	34%-26%-34%	281
PF3D7_1246200	Actin-1	12-11-13	10-10-12	33%-28%-30%	376
PF3D7_1412500	Actin-2	5-3-6	3-2-5	27%-16%-27%	376
PF3D7_0308500	Activator of Hsp90 ATPase, putative	2-2-3	2-2-3	21%-13%-21%	140
PF3D7_1001200	Acyl-CoA binding protein, isoform 2, ACBP2	5-3-4	5-3-4	53%-42%-53%	90

PF3D7_1029600	Adenosine deaminase	5-7-5	5-7-5	17%-24%-17%	367
PF3D7_0520900	Adenosylhomocysteinase	8-9-7	8-9-7	16%-23%-16%	479
PF3D7_1008900	Adenylate kinase 1	9-6-9	9-6-9	29%-26%-30%	242
PF3D7_1020900	ADP-ribosylation factor 1	2-2-3	2-2-3	19%-19%-24%	181
PF3D7_1454400	Aminopeptidase P	20-12-17	20-12-17	29%-19%-27%	777
PF3D7_1149000	Antigen 332, DBL-like protein	59-9-43	57-8-40	12%-02%-10%	6093
PF3D7_0211800	Asparagine--tRNA ligase	6-5-6	6-5-6	14%-12%-13%	610
PF3D7_1235700	ATP synthase subunit beta	8-3-5	8-3-5	24%-08%-13%	535
PF3D7_0626700	ATPase	2-2-3	2-2-3	05%-07%-08%	372
PF3D7_0810600	ATP-dependent RNA helicase DBP1, putative	5-2-5	4-2-4	07%-03%-07%	941
PF3D7_1445900	ATP-dependent RNA helicase DDX5, putative	11-2-6	11-2-6	24%-04%-11%	527
PF3D7_0209800	ATP-dependent RNA helicase UAP56	6-5-3	6-5-3	13%-13%-09%	457
PF3D7_0417200	Bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	4-2-2	4-2-2	09%-04%-06%	608
PF3D7_1445700	Btz domain-containing protein	8-4-13	8-4-13	25%-16%-33%	351
PF3D7_1238100	Calcyclin-binding protein	5-3-5	5-3-5	25%-17%-25%	228
PF3D7_1434200	Calmodulin	8-4-6	8-4-6	53%-41%-53%	149
PF3D7_1223100	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit	7-7-6	7-7-6	14%-16%-10%	441
PF3D7_1136500	Casein kinase I	6-3-5	6-3-5	17%-10%-13%	324
PF3D7_0306800	CCT-beta	9-8-9	9-8-9	21%-18%-22%	533
PF3D7_0619400	Cell division cycle protein 48 homologue, putative	18-10-12	18-10-12	22%-14%-17%	828
PF3D7_0107000	Centrin-1	4-2-3	4-2-3	23%-15%-15%	168
PF3D7_1446600	Centrin-2	3-2-5	3-2-5	27%-17%-37%	168
PF3D7_0816600	Chaperone protein ClpB1	11-4-2	11-4-2	11%-04%-02%	1070
PF3D7_1140200	CHZ domain-containing protein	11-5-12	11-5-12	26%-12%-30%	447
PF3D7_1236100	Clustered-asparagine-rich protein	7-4-8	7-4-8	24%-12%-26%	445
PF3D7_1359400	CUGBP Elav-like family member 1	3-4-3	3-4-3	08%-10%-07%	509
PF3D7_1409800	CUGBP Elav-like family member 2, putative	5-4-4	5-4-4	14%-11%-11%	514
PF3D7_1115400	Cysteine proteinase falcipain 3	2-2-3	2-2-3	04%-04%-05%	492
PF3D7_0302500	Cytoadherence linked asexual protein 3.1	16-6-13	2-1-2	11%-05%-09%	1417
PF3D7_1404100	Cytochrome c, putative	8-3-10	8-3-10	49%-19%-50%	115
PF3D7_1116700	Dipeptidyl aminopeptidase 1	9-7-8	9-7-8	15%-13%-11%	700

PF3D7_0527000	DNA replication licensing factor MCM3	4-2-5	4-2-5	04%-02%-05%	962
PF3D7_0814200	DNA/RNA-binding protein Alba 1	9-4-6	9-4-6	25%-12%-21%	248
PF3D7_1006200	DNA/RNA-binding protein Alba 3	5-3-8	5-3-8	40%-38%-69%	107
PF3D7_1347500	DNA/RNA-binding protein Alba 4	9-10-8	9-10-8	32%-32%-26%	372
PF3D7_1216900	DNA-binding chaperone, putative	5-2-4	5-2-4	05%-03%-04%	939
PF3D7_1364800	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III	2-2-2	2-2-2	10%-12%-10%	205
PF3D7_1473200	DnaJ protein, putative	9-3-10	9-3-10	20%-07%-21%	454
PF3D7_0629200	DnaJ protein, putative	8-7-5	8-7-5	22%-22%-17%	380
PF3D7_1035700	Duffy binding-like merozoite surface protein	6-7-13	6-7-13	09%-10%-18%	697
PF3D7_1033200	Early transcribed membrane protein 10.2	14-9-15	14-9-15	39%-35%-40%	355
PF3D7_0532100	Early transcribed membrane protein 5	6-3-6	6-3-6	24%-23%-24%	181
PF3D7_0108500	ELM2 domain-containing protein	3-3-4	3-3-4	18%-18%-18%	179
PF3D7_1357000	Elongation factor 1-alpha	30-22-29	30-22-29	57%-50%-59%	443
PF3D7_0913200	Elongation factor 1-beta	11-7-12	11-7-12	44%-31%-45%	276
PF3D7_0319600	Elongation factor 1-delta, putative	2-2-3	2-2-3	06%-19%-20%	156
PF3D7_1338300	Elongation factor 1-gamma, putative	3-6-4	3-6-4	08%-13%-11%	411
PF3D7_1451100	Elongation factor 2	19-15-15	19-15-15	20%-17%-19%	832
PF3D7_0730900	EMP1-trafficking protein	25-8-23	12-1-11	32%-17%-29%	2110
PF3D7_1344200	Endoplasmic reticulum chaperone GRP170	25-22-28	25-22-28	24%-27%-28%	932
PF3D7_1108600	Endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein	26-19-33	26-19-33	64%-48%-71%	343
PF3D7_1222300	Endoplasmin, putative	23-17-21	23-17-21	30%-27%-31%	821
PF3D7_1015900	Enolase	14-14-13	14-14-13	35%-32%-30%	446
PF3D7_1036900	Erythrocyte membrane protein pfemp3	26-5-23	26-5-23	18%-05%-19%	1681
PF3D7_0703500	Erythrocyte membrane-associated antigen	15-4-15	15-4-15	08%-02%-08%	2299
PF3D7_1124600	Ethanolamine kinase	9-4-9	9-4-9	22%-10%-21%	423
PF3D7_0422700	Eukaryotic initiation factor 4A-III, putative	3-2-2	3-2-2	09%-07%-07%	390
PF3D7_1010600	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta	2-2-3	2-2-3	09%-09%-14%	222
PF3D7_0517700	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	7-2-4	7-2-4	10%-03%-06%	716
PF3D7_1206200	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	5-2-3	5-2-3	05%-02%-04%	984
PF3D7_0815600	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	8-7-11	8-7-11	37%-28%-40%	268
PF3D7_0716800	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	8-5-9	8-5-9	37%-20%-39%	327

PF3D7_1143400	Eukaryotic translation initiation factor 4C	3-2-3	3-2-3	21%-17%-21%	155
PF3D7_1204300	Eukaryotic translation initiation factor 5A	2-2-3	2-2-3	14%-14%-34%	161
PF3D7_0501000	Exported protein	3-3-3	3-3-3	14%-08%-14%	260
PF3D7_0730800	Exported protein	6-3-6	6-3-6	27%-12%-27%	293
PF3D7_1121600	Exported protein 1	7-6-6	7-6-6	70%-58%-49%	162
PF3D7_1471100	Exported protein 2	5-4-4	5-4-4	16%-17%-13%	287
PF3D7_1441400	FACT complex subunit SSRP1	9-2-5	9-2-5	20%-03%-10%	506
PF3D7_1360800	Falcilysin	16-7-11	16-7-11	14%-07%-11%	1193
PF3D7_1444800	Fructose-bisphosphate aldolase	18-16-19	18-16-19	41%-37%-41%	369
PF3D7_1302100	Gamete antigen 27/25	10-4-11	10-4-11	57%-26%-58%	217
PF3D7_1436000	Glucose-6-phosphate isomerase	11-4-15	11-4-15	17%-07%-23%	579
PF3D7_1416500	Glutamate dehydrogenase	8-2-14	7-2-14	20%-06%-31%	470
PF3D7_1349200	Glutamate--tRNA ligase	4-3-3	4-3-3	06%-05%-04%	863
PF3D7_1212000	Glutathione peroxidase	3-2-4	3-2-4	13%-08%-18%	205
PF3D7_1419300	Glutathione S-transferase	5-3-5	5-3-5	29%-17%-36%	211
PF3D7_1462800	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	16-15-17	16-15-17	38%-33%-33%	337
PF3D7_1216200	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	2-2-2	2-2-2	06%-05%-06%	367
PF3D7_1016300	Glycophorin-binding protein 130	33-20-33	9-7-11	73%-72%-77%	824
PF3D7_1124700	GrpE protein homolog	10-2-10	10-2-10	31%-11%-34%	301
PF3D7_1117700	GTP-binding nuclear protein	13-11-13	13-11-13	59%-54%-59%	214
PF3D7_1033400	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	4-4-6	4-4-6	21%-24%-24%	288
PF3D7_1226300	Haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative	5-4-8	5-4-8	18%-19%-24%	295
PF3D7_1116800	Heat shock protein 101	15-8-8	15-8-8	20%-08%-09%	906
PF3D7_0708800	Heat shock protein 110	13-6-14	13-6-14	17%-06%-21%	873
PF3D7_1015600	Heat shock protein 60	13-10-14	13-10-14	30%-23%-30%	580
PF3D7_0818900	Heat shock protein 70	28-25-27	23-20-22	40%-36%-39%	677
PF3D7_0831700	Heat shock protein 70	20-16-18	15-11-13	30%-26%-28%	679
PF3D7_1134000	Heat shock protein 70	36-24-29	36-24-29	51%-42%-47%	663
PF3D7_0917900	Heat shock protein 70	37-30-36	37-30-36	50%-48%-50%	652
PF3D7_0708400	Heat shock protein 90	30-28-27	30-28-27	36%-37%-36%	745
PF3D7_1118200	Heat shock protein 90, putative	7-3-5	7-3-5	10%-04%-06%	930

PF3D7_1211400	Heat shock protein DNAJ homologue Pfj4	8-3-8	8-3-8	34%-16%-38%	244
PF3D7_1220900	Heterochromatin protein 1	8-3-9	8-3-9	32%-12%-35%	266
PF3D7_0817900	High mobility group protein B2	2-2-2	2-2-2	28%-28%-28%	99
PF3D7_0929400	High molecular weight rhoptry protein 2	26-8-25	26-8-25	21%-08%-22%	1378
PF3D7_0905400	High molecular weight rhoptry protein 3	11-9-11	11-9-11	17%-13%-16%	897
PF3D7_0617800	Histone H2A	4-4-4	3-3-3	35%-35%-35%	132
PF3D7_0320900	Histone H2A	10-6-10	9-5-9	59%-49%-41%	158
PF3D7_0714000	Histone H2B	6-2-6	5-2-5	34%-15%-34%	123
PF3D7_1105100	Histone H2B	6-4-7	5-4-6	38%-26%-44%	117
PF3D7_0617900	Histone H3	5-6-9	2-1-3	26%-25%-26%	136
PF3D7_0610400	Histone H3	7-9-10	4-4-4	34%-34%-35%	136
PF3D7_1105000	Histone H4	9-5-9	9-5-9	59%-49%-59%	103
PF3D7_0527500	Hsc70-interacting protein	7-3-7	7-3-7	09%-06%-09%	458
PF3D7_1437900	HSP40, subfamily A	10-7-8	10-7-8	19%-17%-16%	424
PF3D7_1434300	Hsp70-Hsp90 organising protein	11-6-10	11-6-10	21%-10%-17%	564
PF3D7_1453700	HSP90 co-chaperone p23	7-3-8	7-3-8	24%-17%-24%	275
PF3D7_1012400	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	8-7-5	8-7-5	36%-26%-22%	231
PF3D7_0812400	Importin subunit alpha	6-5-5	6-5-5	13%-12%-09%	545
PF3D7_1003600	Inner membrane complex protein 1c, putative	5-4-7	5-4-7	13%-13%-25%	281
PF3D7_0525800	Inner membrane complex protein 1g, putative	2-2-3	2-2-3	06%-06%-09%	300
PF3D7_0920800	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	7-7-4	7-7-4	16%-15%-09%	510
PF3D7_0511800	Inositol-3-phosphate synthase 1	15-8-17	15-8-17	27%-16%-30%	604
PF3D7_0524000	Karyopherin beta	20-12-16	20-12-16	21%-15%-19%	1123
PF3D7_1468100	Kelch domain-containing protein, putative	8-2-9	8-2-9	04%-01%-04%	2558
PF3D7_1343700	Kelch protein K13	4-2-4	4-2-4	07%-04%-07%	726
PF3D7_0202000	Knob-associated histidine-rich protein	5-3-6	5-3-6	08%-06%-11%	654
PF3D7_1324900	L-lactate dehydrogenase	14-10-10	14-10-10	38%-33%-22%	316
PF3D7_1446200	M17 leucyl aminopeptidase	7-7-6	7-7-6	15%-15%-13%	605
PF3D7_0932300	M18 aspartyl aminopeptidase	4-2-3	4-2-3	08%-05%-07%	570
PF3D7_1311800	M1-family alanyl aminopeptidase	24-23-22	24-23-22	23%-27%-21%	-
PF3D7_1229400	Macrophage migration inhibitory factor	4-2-4	4-2-4	32%-14%-32%	116

PF3D7_1115800	Mago-bind domain-containing protein	7-2-7	7-2-7	22%-04%-22%	304
PF3D7_0500800	Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen	58-16-60	50-14-52	38%-15%-40%	1434
PF3D7_0930300	Merozoite surface protein 1	47-53-57	47-53-57	30%-31%-34%	1720
PF3D7_0206800	Merozoite surface protein 2	7-2-7	7-2-7	35%-19%-35%	272
PF3D7_1035400	Merozoite surface protein 3	5-3-9	5-3-9	20%-13%-28%	354
PF3D7_1035500	Merozoite surface protein 6	7-5-13	7-5-13	19%-21%-28%	371
PF3D7_1335100	Merozoite surface protein 7	14-8-25	14-8-25	36%-20%-46%	351
PF3D7_1228600	Merozoite surface protein 9	12-9-18	12-9-18	16%-14%-25%	743
PF3D7_0523000	Multidrug resistance protein 1	7-3-3	7-3-3	05%-02%-02%	1419
PF3D7_1128200	Multiprotein-bridging factor 1, putative	9-2-12	9-2-12	51%-17%-63%	136
PF3D7_1246400	Myosin A tail domain interacting protein	2-2-2	2-2-2	11%-11%-06%	204
PF3D7_0621800	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	4-2-4	4-2-4	30%-21%-30%	184
PF3D7_1426100	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	3-3-4	3-3-4	25%-25%-30%	171
PF3D7_0813300	NPL domain-containing protein	14-5-14	14-5-14	31%-19%-31%	315
PF3D7_1423700	NTF2 domain-containing protein	14-3-16	14-3-16	11%-03%-13%	1558
PF3D7_1412300	Nuclear transport factor 2	4-3-4	4-3-4	33%-26%-38%	125
PF3D7_1366500	Nucleoside diphosphate kinase	5-5-5	5-5-5	32%-32%-32%	149
PF3D7_1203700	Nucleosome assembly protein	10-6-9	10-6-9	25%-19%-23%	347
PF3D7_0919000	Nucleosome assembly protein	8-6-10	8-6-10	35%-23%-40%	269
PF3D7_0706500	NUFIP1 domain-containing protein	13-2-15	13-2-15	09%-02%-10%	1706
PF3D7_0722400	Obg-like ATPase 1	9-2-7	9-2-7	27%-07%-23%	393
PF3D7_0608800	Ornithine aminotransferase	11-12-11	11-12-11	21%-21%-27%	414
PF3D7_0501200	Parasite-infected erythrocyte surface protein	5-3-4	5-3-4	24%-08%-22%	408
PF3D7_1129100	Parasitophorous vacuolar protein 1	5-4-8	5-4-8	12%-11%-20%	452
PF3D7_0925900	Parasitophorous vacuolar protein 5, putative	5-4-5	5-4-5	18%-18%-18%	217
PF3D7_1115600	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	10-8-12	10-8-12	40%-43%-40%	195
PF3D7_0322000	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3-3-3	3-3-3	16%-22%-16%	171
PF3D7_1247400	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP35	5-5-5	5-5-5	21%-17%-18%	304
PF3D7_1027300	Peroxiredoxin	7-4-8	7-4-8	19%-13%-19%	393
PF3D7_1343000	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	15-15-14	15-15-14	53%-53%-48%	266
PF3D7_0922500	Phosphoglycerate kinase	24-27-26	24-27-26	57%-59%-54%	416

PF3D7_1120100	Phosphoglycerate mutase	18-9-19	18-9-19	62%-44%-64%	250
PF3D7_1325100	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase	9-6-6	9-6-6	26%-18%-16%	437
PF3D7_0624000	Phosphotransferase	5-3-6	5-3-6	13%-09%-14%	493
PF3D7_1407900	Plasmepsin I	9-8-7	9-8-7	24%-21%-20%	452
PF3D7_1408000	Plasmepsin II	6-5-6	6-5-6	19%-13%-19%	453
PF3D7_1408100	Plasmepsin III	15-10-14	15-10-14	38%-25%-34%	451
PF3D7_1407800	Plasmepsin IV	8-6-9	8-6-9	16%-18%-20%	449
PF3D7_1224300	Polyadenylate-binding protein	19-18-23	19-18-23	22%-25%-26%	875
PF3D7_0923900	Polyadenylate-binding protein 2, putative	4-5-3	4-5-3	22%-30%-16%	202
PF3D7_1011800	PRE-binding protein	25-7-20	25-7-20	20%-08%-17%	1139
PF3D7_1416900	Prefoldin subunit 2, putative	8-3-6	8-3-6	56%-21%-50%	147
PF3D7_1201000	PRESAN domain-containing protein	8-6-7	8-6-7	17%-12%-14%	653
PF3D7_0801000	PRESAN domain-containing protein	17-4-15	16-4-14	22%-06%-21%	1219
PF3D7_0402000	PRESAN domain-containing protein	4-3-5	4-3-5	12%-12%-12%	428
PF3D7_0731300	PRESAN domain-containing protein	6-2-6	6-2-6	20%-05%-20%	317
PF3D7_0424600	PRESAN domain-containing protein	4-5-5	4-5-5	17%-19%-19%	309
PF3D7_0936800	PRESAN domain-containing protein	5-2-8	5-2-8	12%-06%-19%	383
PF3D7_1404900	PRESAN domain-containing protein	2-2-3	2-2-3	07%-07%-12%	297
PF3D7_0401800	PRESAN domain-containing protein	10-3-8	10-3-8	21%-07%-14%	560
PF3D7_0532300	PRESAN domain-containing protein	3-4-3	3-4-3	09%-08%-06%	509
PF3D7_0915400	Probable ATP-dependent 6-phosphofructokinase	20-5-20	20-5-20	21%-06%-21%	1418
PF3D7_0512000	Probable prefoldin subunit 6	6-3-8	6-3-8	47%-26%-54%	119
PF3D7_0932200	Profilin	3-5-3	3-5-3	23%-27%-23%	171
PF3D7_1361900	Proliferating cell nuclear antigen 1	8-6-9	8-6-9	42%-31%-43%	274
PF3D7_1428300	Proliferation-associated protein 2g4, putative	8-11-7	8-11-7	21%-28%-21%	377
PF3D7_0907700	Proteasome activator 28 subunit beta, putative	4-2-2	4-2-2	13%-09%-07%	279
PF3D7_0727400	Proteasome subunit alpha type	6-5-6	6-5-6	26%-26%-29%	256
PF3D7_1353900	Proteasome subunit alpha type	3-5-4	3-5-4	12%-22%-19%	241
PF3D7_1353800	Proteasome subunit alpha type	7-2-8	7-2-8	27%-10%-29%	246
PF3D7_1474800	Proteasome subunit alpha type-1, putative	6-5-4	6-5-4	22%-28%-22%	254
PF3D7_0608500	Proteasome subunit alpha type-2, putative	5-3-6	5-3-6	23%-13%-29%	235

PF3D7_0807500	Proteasome subunit alpha type-6, putative	5-5-6	5-5-6	20%-25%-25%	260
PF3D7_1470900	Proteasome subunit beta	5-4-4	5-4-4	16%-21%-22%	195
PF3D7_1328100	Proteasome subunit beta	2-2-4	2-2-4	07%-08%-14%	270
PF3D7_0518300	Proteasome subunit beta	2-3-2	2-3-2	10%-10%-10%	240
PF3D7_0803800	Proteasome subunit beta	4-3-2	4-3-2	18%-15%-11%	265
PF3D7_1134100	Protein disulfide isomerase	3-5-4	3-5-4	09%-14%-11%	423
PF3D7_0827900	Protein disulfide-isomerase	23-19-21	23-19-21	42%-41%-33%	483
PF3D7_0627500	Protein DJ-1	5-5-5	5-5-5	35%-35%-26%	189
PF3D7_0213100	Protein SIS1	10-3-6	10-3-6	28%-09%-21%	328
PF3D7_1410600	Protein-synthesizing GTPase	9-5-6	9-5-6	27%-14%-19%	465
PF3D7_0513300	Purine nucleoside phosphorylase	4-3-7	4-3-7	22%-17%-40%	245
PF3D7_0621200	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit Pdx1	5-5-5	5-5-5	18%-17%-18%	301
PF3D7_1357900	Protein-5-carboxylate reductase, putative	4-4-3	4-4-3	15%-15%-07%	262
PF3D7_0626800	Pyruvate kinase	9-8-8	9-8-8	26%-21%-21%	511
PF3D7_1242800	Rab GDP dissociation inhibitor	7-2-7	7-2-7	21%-05%-19%	459
PF3D7_0419600	Ran-specific GTPase-activating protein 1, putative	11-5-9	11-5-9	30%-17%-26%	280
PF3D7_1320600	Ras-related protein Rab-11A	10-2-6	9-2-6	49%-11%-32%	216
PF3D7_1144900	Ras-related protein Rab-6	6-3-4	6-3-4	31%-16%-20%	207
PF3D7_0826700	Receptor for activated c kinase	7-8-7	7-8-7	34%-35%-35%	323
PF3D7_1116000	Rhoptry neck protein 4	4-2-5	4-2-5	04%-02%-09%	1201
PF3D7_0721400	Rhoptry protein, putative	2-2-3	2-2-3	14%-12%-19%	214
PF3D7_0722200	Rhoptry-associated leucine zipper-like protein 1	11-2-11	11-2-11	15%-04%-17%	749
PF3D7_0707300	Rhoptry-associated membrane antigen	9-3-12	9-3-12	09%-04%-12%	861
PF3D7_1410400	Rhoptry-associated protein 1	15-4-13	15-4-13	21%-10%-23%	782
PF3D7_0501600	Rhoptry-associated protein 2	4-6-6	4-6-6	11%-17%-17%	398
PF3D7_0501500	Rhoptry-associated protein 3	5-3-2	5-3-2	14%-07%-05%	400
PF3D7_1437200	Ribonucleoside-diphosphate reductase	5-2-7	5-2-7	07%-03%-09%	847
PF3D7_1405600	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain	3-2-2	3-2-2	11%-08%-07%	349
PF3D7_0935900	Ring-exported protein 1	19-4-21	17-3-18	43%-13%-50%	713
PF3D7_0936300	Ring-exported protein 3	2-2-3	2-2-3	11%-09%-13%	326
PF3D7_1468700	RNA helicase	11-8-10	11-8-10	37%-28%-33%	398

PF3D7_0916700	RNA-binding protein musashi, putative	7-2-5	7-2-5	23%-07%-13%	388
PF3D7_0823200	RNA-binding protein, putative	7-6-6	7-6-6	32%-32%-28%	286
PF3D7_0605100	RNA-binding protein, putative	6-2-2	6-2-2	08%-03%-03%	755
PF3D7_1004400	RNA-binding protein, putative	8-2-7	8-2-7	12%-02%-10%	880
PF3D7_1110400	RNA-binding protein, putative	14-4-13	14-4-13	10%-03%-10%	1483
PF3D7_1360900	RNA-binding protein, putative	3-2-3	3-2-3	14%-07%-11%	389
PF3D7_1362200	RuvB-like helicase	2-3-2	2-3-2	04%-09%-04%	483
PF3D7_0922200	S-adenosylmethionine synthase	14-11-14	14-11-14	37%-31%-37%	402
PF3D7_1035200	S-antigen protein	11-6-12	9-1-9	74%-64%-74%	585
PF3D7_1235600	Serine hydroxymethyltransferase	11-5-10	11-5-10	24%-12%-21%	442
PF3D7_0207900	Serine repeat antigen 2	2-2-3	1-1-1	03%-02%-04%	1105
PF3D7_0207700	Serine repeat antigen 4	7-4-8	6-3-6	11%-06%-11%	962
PF3D7_0517300	Serine/arginine-rich splicing factor 1	5-4-5	5-4-5	21%-17%-21%	298
PF3D7_0503300	Serine/arginine-rich splicing factor 12	5-3-5	5-3-5	21%-09%-17%	308
PF3D7_1022400	Serine/arginine-rich splicing factor 4	5-4-6	5-4-6	09%-08%-11%	538
PF3D7_1403900	Serine/threonine protein phosphatase CPPED1	3-2-2	3-2-2	12%-04%-08%	298
PF3D7_0207600	Serine-repeat antigen protein 5	21-19-21	20-17-20	23%-22%-22%	997
PF3D7_1006800	Single-strand telomeric DNA-binding protein GBP2	6-3-5	6-3-5	19%-11%-18%	246
PF3D7_0702400	Small exported membrane protein 1	7-3-7	7-3-7	41%-44%-33%	123
PF3D7_0416800	Small GTP-binding protein sar1	7-5-7	7-5-7	49%-34%-40%	192
PF3D7_0505800	Small ubiquitin-related modifier	3-3-3	3-3-3	21%-37%-21%	100
PF3D7_1420700	Surface protein P113	10-3-12	10-3-12	10%-03%-12%	969
PF3D7_1132200	T-complex protein 1 subunit alpha	6-4-3	6-4-3	12%-09%-06%	544
PF3D7_1357800	T-complex protein 1 subunit delta	4-3-2	4-3-2	11%-09%-05%	529
PF3D7_0320300	T-complex protein 1 subunit epsilon	3-3-6	3-3-6	06%-10%-11%	535
PF3D7_0308200	T-complex protein 1 subunit eta	3-4-4	3-4-4	07%-08%-10%	539
PF3D7_1229500	T-complex protein 1 subunit gamma	6-3-5	6-3-5	13%-06%-11%	542
PF3D7_0214000	T-complex protein 1 subunit theta	4-2-2	4-2-2	09%-04%-06%	542
PF3D7_0608700	T-complex protein 1 subunit zeta	3-3-3	3-3-3	09%-09%-07%	543
PF3D7_1205600	Tetratricopeptide repeat protein, putative	6-4-8	6-4-8	23%-17%-30%	333
PF3D7_1457200	Thioredoxin 1	2-2-3	2-2-3	28%-28%-38%	104

PF3D7_1438900	Thioredoxin peroxidase 1	5-7-7	5-7-7	38%-42%-50%	195
PF3D7_1104400	Thioredoxin-like mero protein	5-6-7	5-6-7	15%-17%-19%	424
PF3D7_1126000	Threonine--tRNA ligase	6-3-6	6-3-6	07%-03%-07%	1013
PF3D7_0610800	Transketolase	14-3-10	14-3-10	21%-05%-18%	672
PF3D7_1123400	Translation elongation factor EF-1, subunit alpha, putative	3-2-2	3-2-2	07%-04%-04%	555
PF3D7_1243600	Translation initiation factor SUI1, putative	3-2-3	3-2-3	18%-17%-18%	115
PF3D7_0511000	Translationally-controlled tumor protein homolog	3-2-3	3-2-3	12%-12%-12%	171
PF3D7_0202400	Translation-enhancing factor	10-2-11	8-1-10	14%-05%-13%	1192
PF3D7_1436300	Translocon component PTEX150	15-4-16	15-4-16	17%-07%-20%	993
PF3D7_1105800	Transmembrane protein	3-2-3	3-2-3	12%-09%-11%	266
PF3D7_1439900	Triosephosphate isomerase	9-10-13	9-10-13	23%-34%-46%	248
PF3D7_0903700	Tubulin alpha chain	9-7-9	1-1-1	19%-19%-20%	453
PF3D7_1008700	Tubulin beta chain	9-4-8	9-4-8	17%-08%-17%	445
PF3D7_1136300	Tudor staphylococcal nuclease	4-3-3	4-3-3	03%-03%-03%	1098
PF3D7_1113400	Ubiquitin domain-containing protein DSK2, putative	2-2-3	2-2-3	08%-05%-10%	388
PF3D7_0527100	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N, putative	3-3-3	3-3-3	31%-31%-32%	152
PF3D7_0702500	Uncharacterized protein	10-3-11	10-3-11	53%-19%-53%	253
PF3D7_0821400	Uncharacterized protein	4-2-4	4-2-4	29%-10%-30%	124
PF3D7_0914400	Uncharacterized protein	7-2-8	7-2-8	30%-09%-37%	249
PF3D7_1135400	Uncharacterized protein	7-2-6	7-2-6	32%-07%-28%	245
PF3D7_1366900	Uncharacterized protein MAL13P1.336	12-3-18	12-3-18	18%-09%-24%	685
PF3D7_1120000	Uncharacterized protein PF3D7_1120000	17-10-19	11-5-12	27%-25%-34%	1070
PF3D7_1011700	UV excision repair protein RAD23	5-2-5	5-2-5	19%-05%-14%	389
PF3D7_0406100	Vacuolar proton pump subunit B	8-4-8	8-4-8	20%-13%-22%	494
PF3D7_1439800	Vesicle-associated membrane protein, putative	2-2-2	2-2-2	09%-12%-13%	241
PF3D7_0617200	Viral a-type inclusion protein	14-5-12	14-5-12	29%-13%-20%	446
PF3D7_1432100	Voltage-dependent anion-selective channel protein	7-2-8	7-2-8	23%-09%-24%	289
PF3D7_1311900	V-type proton ATPase catalytic subunit A	10-6-8	10-6-8	18%-10%-15%	611
PF3D7_1323200	V-type proton ATPase subunit G, putative	6-3-7	6-3-7	44%-28%-47%	123

Anexo 7. Proteínas do *P. falciparum* exclusivas da fração membranar

PlasmoDB ID	Gene	Descrição	Famílias de proteínas y domínios conservados
Proteínas exportadas e a remodelação do eritrócito			
PF3D7_0201800	KAHSP40	knob associated heat shock protein 40	DnaJ domain;Chaperone DnaJ, C-terminal
PF3D7_0201900	EMP3	erythrocyte membrane protein 3	N/A
PF3D7_0102200	RESA	ring-infected erythrocyte surface antigen	DnaJ domain;Plasmodium RESA, N-terminal;DNAJ-containing protein, X-domain
PF3D7_1149200	RESA3	ring-infected erythrocyte surface antigen	DnaJ domain;Plasmodium RESA, N-terminal;DNAJ-containing protein, X-domain
PF3D7_1035300	GLURP	glutamate-rich protein GLURP	N/A
PF3D7_0731100	PTP2	EMP1-trafficking protein	Plasmodium RESA, N-terminal
Proteínas envolvidas no tráfico vesicular e membranas			
PF3D7_0807300	RAB18	ras-related protein Rab-18	Small GTPase
PF3D7_0512600	RAB1b	ras-related protein Rab-1B	Small GTPase
PF3D7_1324700	YKT6.2	SNARE protein, putative	Synaptobrevin
PF3D7_1456800	VP1	V-type H(+)-translocating pyrophosphatase, putative	Pyrophosphate-energised proton pump
PF3D7_1442300	tRIP	tRNA import protein tRIP	tRNA-binding domain
Enzimas ligadas ao metabolismo lipídico			
PF3D7_0525100	ACS10	acyl-CoA synthetase	AMP-dependent synthetase/ligase
PF3D7_1238800	ACS11	acyl-CoA synthetase	AMP-dependent synthetase/ligase
Sinalização mediada por fosforilação			
PF3D7_0217500	CDPK1	calcium-dependent protein kinase 1	Protein kinase domain;EF-hand domain
PF3D7_0934800	PKAc	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit	Protein kinase domain
PF3D7_1138500	PPM2	protein phosphatase PPM2, protein phosphatase 2C	PPM-type phosphatase domain

Maquinaria de síntese e degradação proteica

PF3D7_0728000	eIF2alpha	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha	S1 domain; Translation initiation factor 2, alpha subunit
PF3D7_1212700	EIF3A	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A, putative	Proteasome component (PCI) domain
PF3D7_1007900	EIF3D	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D, putative	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D
PF3D7_0528200	EIF3E	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E, putative	Proteasome component (PCI) domain
PF3D7_1419700	EIF3H	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H, putative	N/A
PF3D7_0612100	EIF3L	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L, putative	Translation initiation factor 3 complex subunit L
PF3D7_0418200	EIF3M	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M, putative	Proteasome component (PCI) domain
PF3D7_0315100	eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	Translation Initiation factor eIF- 4e
PF3D7_1145400	DYN1	dynamamin-like protein	Dynamamin superfamily; Dynamamin central domain; Dynamamin GTPase effector
PF3D7_1466300	RPN2	26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative	Proteasome/cyclosome repeat; 26S proteasome regulatory subunit RPN2, C-terminal
PF3D7_1338100	RPN3	26S proteasome regulatory subunit RPN3, putative	Proteasome component (PCI) domain; 26S proteasome regulatory subunit, C-terminal
PF3D7_1129200	RPN7	26S proteasome regulatory subunit RPN7, putative	Proteasome component (PCI) domain; 26S proteasome regulatory subunit Rpn7/COP9 signalosome complex subunit 1
PF3D7_1311500	RPT1	26S protease regulatory subunit 7, putative	ATPase, AAA-type, core; AAA ATPase, AAA+ lid domain

Proteínas essenciais para a invasão e organelas apicais

PF3D7_1133400	AMA1	apical membrane antigen 1	Apical membrane antigen 1
PF3D7_0935800	CLAG9	cytoadherence linked asexual protein 9	Cytoadherence-linked asexual protein
PF3D7_1252100	RON3	roptry neck protein 3	N/A

Componentes do motor actomiosínico e do citoesqueleto

PF3D7_1342600	MYOA	myosin A	Myosin head, motor domain
Outras			
PF3D7_1034900	MRScyt	methionine--tRNA ligase	Methionyl/Leucyl tRNA synthetase
PF3D7_1107300	PAIP1	polyadenylate-binding protein-interacting protein 1, putative	N/A
PF3D7_0524400	RBG1	ribosome-interacting GTPase 1, putative	GTP binding domain;TGS;GTP binding protein, second domain
PF3D7_0516900	RPL2	60S ribosomal protein L2	Ribosomal Proteins L2, RNA binding domain;Ribosomal protein L2, C-terminal
PF3D7_1323400	RPL23	60S ribosomal protein L23	Ribosomal protein L25/L23;Ribosomal protein L23/L25, N-terminal
PF3D7_1130100	RPL38	60S ribosomal protein L38	Ribosomal protein L38e
PF3D7_1451800	SORTLR	sortilin	Sortilin, C-terminal;Sortilin, N-terminal
PF3D7_1003500	N/A	40S ribosomal protein S20e, putative	Ribosomal protein S10 domain
PF3D7_1461300	N/A	40S ribosomal protein S28e, putative	Ribosomal protein S28e
PF3D7_0721600	N/A	40S ribosomal protein S5, putative	Ribosomal protein S7 domain
PF3D7_1431700	N/A	60S ribosomal protein L14, putative	Ribosomal protein L14e domain
PF3D7_0415900	N/A	60S ribosomal protein L15, putative	Ribosomal protein L15e
PF3D7_1351400	N/A	60S ribosomal protein L17, putative	Ribosomal protein L22/L17
PF3D7_1309100	N/A	60S ribosomal protein L24, putative	Ribosomal protein L24e-related
PF3D7_0307200	N/A	60S ribosomal protein L7, putative	Ribosomal protein L30, ferredoxin-like fold domain;Ribosomal protein L30, N-terminal
PF3D7_1424400	N/A	60S ribosomal protein L7-3, putative	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45
PF3D7_1334200	N/A	chaperone binding protein, putative	Activator of Hsp90 ATPase, N-terminal
PF3D7_0606700	N/A	coatomer alpha subunit, putative	WD40 repeat;Coatomer, WD associated region;Coatomer, alpha subunit, C-terminal
PF3D7_1127600	N/A	CRAL/TRIO domain-containing protein, putative	CRAL-TRIO lipid binding domain
PF3D7_0806500	N/A	DnaJ protein, putative	DnaJ domain;DNAJ-containing protein, X-domain
PF3D7_0910100	N/A	exportin-7, putative	N/A

PF3D7_0706000	N/A	importin-7, putative	Importin-beta, N-terminal domain
PF3D7_1457300	N/A	MA3 domain-containing protein	Initiation factor eIF-4 gamma, MA3
PF3D7_0912500	N/A	SAP domain-containing protein	SAP domain
PF3D7_0607000	N/A	Translation initiation factor IF-2	Transcription factor, GTP-binding domain; Translation initiation factor IF- 2, domain 3
PF3D7_0627700	N/A	Transportin	Importin-beta, N-terminal domain
PF3D7_1341900	N/A	V-type proton ATPase subunit D	ATPase, V1 complex, subunit D

Anexo 8. Identificação de proteínas de membrana em frações subcelulares de *P. falciparum* por comparação com banco de dados especializados

Código PlasmoDB	Gene	Descrição	NDT	RA
Fração Parasitaria, HT-PTEX				
PF3D7_1109900	RPL36	60S ribosomal protein L36	0	
Interseção das Frações M+P, HT-PTEX				
PF3D7_0730800	N/A	Plasmodium exported protein, unknown function	0	
PF3D7_1201000	N/A	Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function	0	
PF3D7_0925900	LCN	Lipocalin	0	
PF3D7_1471100	EXP2	Exported protein 2	0	
Fração Parasitaria, HT-PTEX, <i>In silico</i>				
PF3D7_0730900	PTP4	EMP1-trafficking protein	1	
PF3D7_0936800	N/A	Plasmodium exported protein (phistc), unknown function	1	
PF3D7_1407800	PM4	Plasmepsin IV	1	
Fração Membranar, HT-PTEX, <i>In silico</i>				
PF3D7_0201900	EMP3	Erythrocyte membrane protein 3	1	
PF3D7_0731100	PTP2	EMP1-trafficking protein	1	
PF3D7_1149200	RESA3	Ring-infected erythrocyte surface antigen	0	Sim
Interseção das Frações M+P, HT-PTEX, <i>In silico</i>				
PF3D7_0202000	KAHRP	Knob-associated histidine-rich protein	0	
PF3D7_0401800	PfD80	Plasmodium exported protein (phistb), unknown function	1	
PF3D7_0402000	N/A	Plasmodium exported protein (phista), unknown function	1	
PF3D7_0424600	N/A	Plasmodium exported protein (phistb)	0	
PF3D7_0500800	MESA	Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen	0	Sim
PF3D7_0532300	N/A	Plasmodium exported protein (phistb), unknown function	0	Sim

PF3D7_0936300	REX3	Ring-exported protein 3	1	
Interseção das Frações M+P, <i>In silico</i>				
PF3D7_0702400	SEMP1	Small exported membrane protein 1	1	Sim
PF3D7_0703500	N/A	Erythrocyte membrane-associated antigen	0	
PF3D7_0801000	N/A	Plasmodium exported protein (phistc)	1	Sim
PF3D7_0827900	PDI8	Protein disulfide-isomerase	1	
PF3D7_0905400	RhopH3	High molecular weight rhoptry protein 3	0	Sim
PF3D7_0930300	MSP1	Merozoite surface protein 1	1	Sim
PF3D7_1121600	EXP1	Exported protein 1	1	
PF3D7_1311800	M1AAP	M1-family alanyl aminopeptidase	1	Sim
PF3D7_1408100	PMIII	Plasmepsin III	1	
Fração Membranar, <i>In silico</i>				
PF3D7_0201800	KAHsp40	Knob associated heat shock protein 40	1	
PF3D7_0528200	EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E, putative	2	
PF3D7_0612100	EIF3L	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L, putative	2	
PF3D7_0935800	CLAG9	Cytoadherence linked asexual protein 9	2	
PF3D7_1127600	N/A	CRAL/TRIO domain-containing protein, putative	0	
PF3D7_1133400	AMA1	Apical membrane antigen 1	1	
PF3D7_1202600	NEMF	Nuclear export mediator factor NEMF, putative	0	Sim
PF3D7_1219100	CHC	Clathrin heavy chain, putative	0	
PF3D7_1342600	MyoA	Myosin A	0	
PF3D7_1451800	SORTLR	Sortilin	2	
PF3D7_1456800	VP1	V-type H(+)-translocating pyrophosphatase, putative	16	
PF3D7_1466300	RPN2	26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative	0	Sim
Florens et al., 2004				
PF3D7_1105800	N/A	Conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	1	
PF3D7_1033200	ETRAMP10.2	Early transcribed membrane protein 5	2	Sim

PF3D7_0532100	ETRAMP5	Golgi protein 1	1	Sim
PF3D7_0310400	PIESP1	Parasite-infected erythrocyte surface protein	0	
PF3D7_0501200	PIESP2	Parasitophorous vacuolar protein 2	3	Sim
PF3D7_0501000	N/A	Plasmodium exported protein, unknown function	1	
PF3D7_0702500	N/A	Plasmodium exported protein, unknown function	1	
PF3D7_1252100	RON3	Rhoptry neck protein 3	3	Sim
PF3D7_0935900	REX1	Ring-exported protein 1	1	Sim
PF3D7_0104200	N/A	Star-related lipid transfer protein	0	
PF3D7_1436300	PTEX150	Translocon component PTEX150	0	Sim

NDT: Número de domínios transmembrana (PlasmoDB), **RA:** Resposta de anticorpos (Crompton et al., 2010)

Anexo 9. Distribuição de proteínas de *P. falciparum* em clusters com base na rede de interações

Código PlasmDB	Descrição
Cluster #1	
PF3D7_0307200	60S ribosomal protein L7, putative.
PF3D7_0309600	60S acidic ribosomal protein P2; Plays an important role in the elongation step of protein synthesis.
PF3D7_0316800	40S ribosomal protein S15A, putative; Belongs to the universal ribosomal protein uS8 family.
PF3D7_0317600	40S ribosomal protein S11, putative; Belongs to the universal ribosomal protein uS17 family.
PF3D7_0322900	40S ribosomal protein S3a; Belongs to the eukaryotic ribosomal protein eS1 family.
PF3D7_0415900	Ribosomal protein L15; Belongs to the eukaryotic ribosomal protein eL15 family.
PF3D7_0422400	40S ribosomal protein S19.
PF3D7_0507100	60S ribosomal protein L4.
PF3D7_0516200	40S ribosomal protein S11; Belongs to the universal ribosomal protein uS11 family.
PF3D7_0516900	60S ribosomal protein L2.
PF3D7_0517000	60S ribosomal protein L12, putative; Belongs to the universal ribosomal protein uL11 family.
PF3D7_0520000	40S ribosomal protein S9, putative; Belongs to the universal ribosomal protein uS4 family.
PF3D7_0618300	60S ribosomal protein L27a, putative; Belongs to the universal ribosomal protein uL15 family.
PF3D7_0719700	40S ribosomal protein S10, putative.
PF3D7_0721600	40S ribosomal protein S5, putative; Belongs to the universal ribosomal protein uS7 family.
PF3D7_0813900	40S ribosomal protein S16, putative; Belongs to the universal ribosomal protein uS9 family.
PF3D7_1003500	40S ribosomal protein S20e, putative.
PF3D7_1004000	60S ribosomal protein L13, putative.
PF3D7_1026800	40S ribosomal protein SA; Required for the assembly and/or stability of the 40S ribosomal subunit.
PF3D7_1027800	60S ribosomal protein L3; Belongs to the universal ribosomal protein uL3 family.
PF3D7_1105400	40S ribosomal protein S4; Belongs to the eukaryotic ribosomal protein eS4 family.
PF3D7_1126200	40S ribosomal protein S18, putative; Belongs to the universal ribosomal protein uS13 family.
PF3D7_1130100	60S ribosomal protein L38; Belongs to the eukaryotic ribosomal protein eL38 family.
PF3D7_1130200	60S acidic ribosomal protein P0; Ribosomal protein P0 is the functional equivalent of E.coli protein L10.
PF3D7_1142500	60S ribosomal protein L28.
PF3D7_1142600	60S ribosomal protein L35ae, putative.
PF3D7_1144000	40S ribosomal protein S21; Belongs to the eukaryotic ribosomal protein eS21 family.
PF3D7_1242700	40S ribosomal protein S17, putative.
PF3D7_1302800	40S ribosomal protein S7; Belongs to the eukaryotic ribosomal protein eS7 family.
PF3D7_1309100	60S ribosomal protein L24, putative.

PF3D7_1323100	60S ribosomal protein L6, putative.
PF3D7_1323400	60S ribosomal protein L23; Belongs to the universal ribosomal protein uL23 family.
PF3D7_1338200	60S ribosomal protein L6, putative.
PF3D7_1341200	60S ribosomal protein L18a; Belongs to the eukaryotic ribosomal protein eL20 family.
PF3D7_1342000	40S ribosomal protein S6.
PF3D7_1351400	60S ribosomal protein L17, putative; Belongs to the universal ribosomal protein uL22 family.
PF3D7_1358800	40S ribosomal protein S15; Belongs to the universal ribosomal protein uS15 family.
PF3D7_1408600	40S ribosomal protein S8; Belongs to the eukaryotic ribosomal protein eS8 family.
PF3D7_1421200	40S ribosomal protein S25; Belongs to the eukaryotic ribosomal protein eS25 family.
PF3D7_1424100	60S ribosomal protein L5, putative.
PF3D7_1424400	60S ribosomal protein L7-3, putative.
PF3D7_1426000	60S ribosomal protein L21.
PF3D7_1428300	Proliferation-associated protein 2g4, putative.
PF3D7_1431700	60S ribosomal protein L14, putative.
PF3D7_1441200	60S ribosomal protein L1, putative.
PF3D7_1447000	40S ribosomal protein S5; Belongs to the universal ribosomal protein uS5 family.
PF3D7_1451100	Elongation factor 2.
PF3D7_1460700	60S ribosomal protein L27.
PF3D7_1461300	40S ribosomal protein S28e, putative.
PF3D7_1465900	40S ribosomal protein S3.

Cluster #2

PF3D7_0418200	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M.
PF3D7_0517700	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B.
PF3D7_0528200	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E.
PF3D7_0612100	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L.
PF3D7_0716800	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I.
PF3D7_0728000	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha.
PF3D7_0815600	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G.
PF3D7_1007900	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D.
PF3D7_1206200	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C.
PF3D7_1212700	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A.
PF3D7_1243600	Translation initiation factor SUI1, putative.
PF3D7_1410600	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma, putative.

PF3D7_1419700

Uncharacterized protein.

Cluster #3

PF3D7_0205900

26S proteasome regulatory subunit RPN1, putative.

PF3D7_0413600

26S protease regulatory subunit 6B, putative; Belongs to the AAA ATPase family.

PF3D7_0727400

Proteasome subunit alpha type.

PF3D7_1008400

26S protease regulatory subunit 4, putative; Belongs to the AAA ATPase family.

PF3D7_1129200

26S proteasome regulatory subunit RPN7, putative.

PF3D7_1130400

26S protease regulatory subunit 6A, putative; Belongs to the AAA ATPase family.

PF3D7_1311500

26S protease regulatory subunit 7, putative; Belongs to the AAA ATPase family.

PF3D7_1338100

26S proteasome regulatory subunit RPN3, putative.

PF3D7_1353900

Proteasome subunit alpha type.

PF3D7_1368100

26S proteasome regulatory subunit RPN11, putative.

PF3D7_1466300

26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative; Belongs to the proteasome subunit S1 family.

PF3D7_1474800

Proteasome endopeptidase complex; Belongs to the peptidase T1A family.

Cluster #4

PF3D7_0214000

T-complex protein 1 subunit theta.

PF3D7_0306800

T-complex protein 1 subunit beta.

PF3D7_0308200

T-complex protein 1 subunit eta; Molecular chaperone

PF3D7_0320300

T-complex protein 1 subunit epsilon.

PF3D7_0608700

T-complex protein 1 subunit zeta.

PF3D7_1132200

T-complex protein 1 subunit alpha.

PF3D7_1229500

T-complex protein 1 subunit gamma.

PF3D7_1357800

T-complex protein 1 subunit delta.

PF3D7_1434300

ST11-like protein.

Cluster #5

PF3D7_0406100

Vacuolar proton pump subunit B

PF3D7_1311900

V-type proton ATPase catalytic subunit A

PF3D7_1323200

V-type proton ATPase subunit G, putative.

PF3D7_1341900

V-type proton ATPase subunit D, putative.

Cluster #6

PF3D7_0905400
PF3D7_0929400

High molecular weight rhoptry protein 3.
High molecular weight rhoptry protein 2.

Cluster #7

PF3D7_0818900
PF3D7_0831700

Heat shock protein 70; Belongs to the heat shock protein 70 family.
Heat shock protein 70; Belongs to the heat shock protein 70 family.

Cluster #8

PF3D7_0320900
PF3D7_1105000

Histone H2A; Belongs to the histone H2A family.
Histone H4; Core component of nucleosome.

Cluster #9

PF3D7_0934800
PF3D7_1223100

cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit; Belongs to the protein kinase superfamily.
cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit.

Cluster #10

PF3D7_1117700
PF3D7_1357000

GTP-binding nuclear protein; GTP-binding protein involved in nucleocytoplasmic transport.
Elongation factor 1-alpha

Cluster #11

PF3D7_0102200
PF3D7_1149200

Ring-infected erythrocyte surface antigen.
Ring-infected erythrocyte surface antigen.

Cluster #12

PF3D7_1246200
PF3D7_1342600

Actin-1
Myosin-A; Myosins are actin-based motor molecules with ATPase activity.

Cluster #13

PF3D7_0708400
PF3D7_1453700

Heat shock protein 90.
HSP90 co-chaperone p23.






Anexo 10. Enriquecimento funcional de proteínas de *P. falciparum* com base em ontologias biológicas e vias metabólicas

Fonte	Nome do termo	ID do termo (GO)	Valor-p ajustado
GO:MF	Molecular function	GO:0003674	$6,067 \times 10^{-4}$
GO:MF	structural constituent of ribosome	GO:0003735	$6,131 \times 10^{-4}$
GO:MF	structural molecule activity	GO:0005198	$1,270 \times 10^{-3}$
GO:MF	protein folding chaperone	GO:0044183	$3,864 \times 10^{-3}$
GO:MF	ATP-dependent protein folding chaperone	GO:0140662	$3,880 \times 10^{-3}$
GO:BP	protein metabolic process	GO:0019538	$3,293 \times 10^{-6}$
GO:BP	translation	GO:0006412	$5,305 \times 10^{-3}$
GO:CC	cytosol	GO:0005829	$1,040 \times 10^{-8}$
GO:CC	cytoplasm	GO:0005737	$1,680 \times 10^{-8}$
GO:CC	intracellular anatomical structure	GO:0005622	$3,941 \times 10^{-4}$
GO:CC	ribosomal subunit	GO:0044391	$1,789 \times 10^{-3}$
GO:CC	ribosome	GO:0005840	$2,176 \times 10^{-3}$
GO:CC	cytosolic ribosome	GO:0022626	$3,291 \times 10^{-3}$
GO:CC	protein-containing complex	GO:0032991	$5,947 \times 10^{-3}$
GO:CC	cellular_component	GO:0005575	$1,001 \times 10^{-2}$
GO:CC	ribonucleoprotein complex	GO:1990904	$2,057 \times 10^{-2}$
GO:CC	intracellular membraneless organelle	GO:0043232	$2,404 \times 10^{-2}$
GO:CC	cellular anatomical structure	GO:0110165	$3,326 \times 10^{-2}$
GO:CC	membraneless organelle	GO:0043228	$3,826 \times 10^{-2}$
KEGG	Ribosome	KEGG:03010	$2,484 \times 10^{-4}$
REAC	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	REAC:R-PFA-72706	$6,675 \times 10^{-5}$
REAC	Eukaryotic Translation Initiation	REAC:R-PFA-72613	$6,675 \times 10^{-5}$
REAC	Cap-dependent Translation Initiation	REAC:R-PFA-72737	$6,675 \times 10^{-5}$
REAC	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	REAC:R-PFA-156827	$1,291 \times 10^{-4}$
REAC	Formation of a pool of free 40S subunits	REAC:R-PFA-72689	$2,484 \times 10^{-4}$
REAC	Ribosomal scanning and start codon recognition	REAC:R-PFA-72702	$6,579 \times 10^{-4}$

REAC	Metabolism of proteins	REAC:R-PFA-392499	9,063×10 ⁻⁴
REAC	Eukaryotic Translation Elongation	REAC:R-PFA-156842	1,318×10 ⁻³
REAC	Translation initiation complex formation	REAC:R-PFA-72649	1,423×10 ⁻³
REAC	Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	REAC:R-PFA-72662	1,423×10 ⁻³
REAC	Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	REAC:R-PFA-72695	1,423×10 ⁻³
REAC	Peptide chain elongation	REAC:R-PFA-156902	1,634×10 ⁻²
REAC	Selenoamino acid metabolism	REAC:R-PFA-2408522	2,030×10 ⁻²
REAC	rRNA processing	REAC:R-PFA-72312	3,708×10 ⁻²
REAC	Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	REAC:R-PFA-6791226	3,708×10 ⁻²
REAC	Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)	REAC:R-PFA-975956	3,708×10 ⁻²
REAC	Selenocysteine synthesis	REAC:R-PFA-2408557	3,708×10 ⁻²
REAC	rRNA processing in the nucleus and cytosol	REAC:R-PFA-8868773	3,708×10 ⁻²

Review

Next-Generation Protein–Ligand Interaction Networks: APEX as a Powerful Technology

José Miguel Quintero-Ferrer ¹, Lucas Silva de Oliveira ¹, Paula Marian Vieira Goulart ^{1,2},
Thiago Albuquerque Souza Campos ^{1,2}, Coralie Martin ², Philippe Grellier ², Izabela Marques Dourado Bastos ³
and Sébastien Charneau ^{1,*}

¹ Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil; jochemiguel22@gmail.com (J.M.Q.-F.); lucassoliveira@outlook.fr (L.S.d.O.); paulamvgoulart@gmail.com (P.M.V.G.); thiagocampos0301@hotmail.com (T.A.S.C.)

² UMR 7245 MCAM Molecules of Communication and Adaptation of Microorganisms, Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, 75231 Cedex 05 Paris, France; coralie.martin@mnhn.fr (C.M.); philippe.grellier@mnhn.fr (P.G.)

³ Pathogen-Host Interface Laboratory, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil; dourado@unb.br

* Correspondence: charneau@unb.br

Abstract

Peroxidases are essential enzymes that catalyze redox reactions, with wide-ranging biological implications. Among these, an enhanced ascorbate peroxidase (APEX) has emerged as a valuable tool for studying intricate intracellular events with spatiotemporal precision, particularly in protein–protein, protein–RNA, and protein–DNA interaction networks in living cells. This review discusses APEX's structural and functional attributes, its evolution through genetic engineering, and its transformative applications in high-resolution mapping used for proteomic and transcriptomic studies. Furthermore, it highlights recent advancements in substrate innovation and addresses current challenges and future directions in leveraging APEX for cutting-edge biological research.

Keywords: protein–protein interactions; proximity labeling; molecular networks; protein interactomes; engineered ascorbate peroxidase; mass spectrometry



Received: 31 March 2025

Revised: 29 May 2025

Accepted: 16 June 2025

Published: 23 June 2025

Citation: Quintero-Ferrer, J.M.; de Oliveira, L.S.; Goulart, P.M.V.; Campos, T.A.S.; Martin, C.; Grellier, P.; Bastos, I.M.D.; Charneau, S. Next-Generation Protein–Ligand Interaction Networks: APEX as a Powerful Technology. *Proteomes* **2025**, *13*, 26. <https://doi.org/10.3390/proteomes13030026>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Protein–ligand interactions, which form the basis of diverse biomolecular networks, are central to deciphering the complex mechanisms that regulate cellular functions. The biological activity of proteins is intrinsically linked to their ability to interact with other molecules, including an antibody with an antigen [1], a protein receptor with a ligand [2], a transport protein with a ligand [3], an enzyme with a substrate [4], and cytoskeleton meshwork proteins with mechanical properties [5]. The ligands could be inorganic or organic compounds, including vitamins [6], hormones [7], nucleic acids [8], carbohydrates [9], lipids [10], and proteins [11]. These interactions regulate critical pathways, such as signal transduction, gene expression, metabolic processes, cell differentiation, and cellular adaptation to environmental changes, making them essential targets for scientific and therapeutic exploration.

Despite their importance, studying these complex interactions in living cells poses significant challenges due to the dynamic, transient, and spatially restricted nature of

biomolecular interactions. Therefore, advanced tools are required to enable the precision, versatility, and high-resolution capabilities necessary to map protein–ligand interactions effectively. Among these tools, L-ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) is a Class I cytosolic heme peroxidase that remains catalytically active under reducing conditions. Naturally expressed in plants, chlorophytes, red algae, and certain protists, APX plays a central role in detoxifying excess hydrogen peroxide. This enzyme catalyzes the reduction of hydrogen peroxide to water using ascorbate as an electron donor. This enzymatic activity is crucial for maintaining redox homeostasis and limiting oxidative damage, thereby underscoring its essential role in hydrogen peroxide regulation within plant cells [12,13].

Enhanced variants of APX (APEX) have further improved the labeling specificity, efficiency, and cellular targeting, enabling the detailed mapping of biomolecular interactions across subcellular compartments [14,15]. The utility of APEX extends beyond proteomics, offering significant advantages in mapping specific cell compartments and studying protein interactomes, cellular structures, and subcellular processes in living cells. These advancements underscore APEX's versatility and potential to drive deeper insights into molecular mechanisms. This review provides a comprehensive analysis of APEX technology, detailing its structural and functional attributes, engineering advancements, and applications in proteomic and transcriptomic studies. Additionally, we explore the latest innovations in APEX-based labeling strategies, addressing current limitations and potential future directions.

2. Peroxidase

Peroxidases are a diverse class of enzymes involved in redox reactions, which mediate the electron transfer between substrates. Their primary role involves the reduction of hydrogen peroxide, an electron acceptor, through the oxidation of various organic and inorganic substrates. These enzymes are ubiquitous across all five kingdoms of life, playing essential roles in processes such as cellular signaling, the defense against oxidative stress, and the metabolism of reactive oxygen species [16]. Peroxidases are generally classified into two main groups: heme-containing peroxidases and non-heme-containing peroxidases [17].

Heme-containing peroxidases are characterized by the presence of a heme b group, an organometallic compound that serves as a prosthetic group in these enzymes. The heme group is a coordination complex containing an iron (III) ion bound to protoporphyrin IX, which facilitates electron transfer during substrate oxidation and supports efficient redox activity. A key structural feature of these enzymes is the conserved histidine residue that acts as the proximal ligand to the iron atom, along with conserved arginine and histidine residues functioning as distal ligands [18,19]. This arrangement is essential for both catalytic efficiency and substrate specificity.

Non-animal heme-containing peroxidases are categorized into three distinct classes, each with specialized functions. Class I, the most divergent, primarily neutralizes excess hydrogen peroxide [20]. Class II consists of fungal manganese and lignin peroxidases, which play a key role in lignin degradation [21]. Class III, the largest group, includes plant secretory peroxidases involved in the oxidation of lignin, auxin, and secondary metabolites [22].

The functional versatility of peroxidases is exemplified by horseradish peroxidase (HRP), one of the most extensively studied members of this enzyme family, which is a glycoprotein incorporating a heme group and two calcium ions, both critical for its structural stability and catalytic activity [23,24]. In molecular biology, HRP is invaluable for signal detection and amplification, catalyzing the oxidation of chromogenic and chemiluminescent substrates to generate measurable signals in assays such as the ELISA, Western blotting, and immunohistochemistry [25,26].

The catalytic adaptability of HRP extends to the oxidation of a broad spectrum of phenolic substrates, making it a valuable tool for protein labeling and conjugation strategies [27]. This versatility arises from its flexible active site architecture, which accommodates structurally diverse compounds. This broad substrate specificity has driven research aimed at improving HRP's stability and activity under non-native conditions, including the engineering of HRP variants to enhance its substrate specificity, thermal stability, and resistance to inactivation. These efforts aim to optimize HRP for applications in synthetic biology, diagnostics, and industrial processes.

3. APX: A Robust Intracellular Peroxidase

A significant limitation of HRP is its inactivation within the mammalian cytosol, primarily due to the reducing environment [12]. This environment disrupts the formation of disulfide bonds and interferes with calcium-binding sites, both essential for HRP's structural stability and catalytic function. Moreover, the limited cytosolic availability of calcium further exacerbates these challenges, severely compromising the HRP activity and restricting its utility in intracellular studies, such as protein interaction analysis and cellular process exploration [28].

To address these limitations, APX has emerged as a superior alternative. Unlike HRP, APX is inherently adapted to intracellular conditions, maintaining stability and catalytic efficiency in the absence of disulfide bonds or calcium ions [12]. This unique characteristic allows APX to function effectively in environments where HRP is rendered inactive, establishing it as an indispensable tool for investigating intracellular processes.

APX, a heme-containing Class I peroxidase, regulates intracellular hydrogen peroxide levels by catalyzing the oxidation of L-ascorbate (ascorbic acid), which is predominantly synthesized via the D-mannose/L-galactose pathway in plants [29]. This activity is essential for maintaining redox homeostasis, thereby enhancing cellular defense mechanisms in plants, algae, and certain cyanobacteria [18,30,31]. Owing to its versatile chemistry, ascorbate functions as a free radical scavenger and a reductant for iron and copper [32,33]

Beyond its role in redox regulation, APX also modulates oxidative stress-responsive signaling pathways, enabling plants to adapt to a variety of environmental challenges. In higher plants, APX isoenzymes are distributed across multiple cellular compartments, differing in both their subcellular localization and amino acid sequences. They are found in the stroma and thylakoid membranes of chloroplasts, as well as in the membranes of glyoxysomes, peroxisomes, and the cytosol. These characteristics underscore the critical role of APX in safeguarding cellular integrity, maintaining redox homeostasis across distinct organelles, and facilitating adaptive responses under stress conditions [34–40].

The cytosolic form of APX typically exists as a dimer composed of identical subunits, each with a molecular mass of approximately 28 kDa, which is approximately 40% smaller than HRP [12]. While this dimeric configuration exhibits a high peroxidase activity, isoforms localized to chloroplasts or mitochondria may assemble into different oligomeric states, including homodimer and complexes [41–43]. Notably, APX demonstrates a catalytic activity across a broad temperature range of 20–37 °C and at a pH of 7.0 [44,45]. This range is significant as it closely aligns with the optimal temperature for many enzymes commonly found in warm-blooded organisms.

Structurally, APX distinguishes itself from HRP by the absence of disulfide bonds, signal peptides, and glycosylation, features commonly associated with the stability and targeting of other peroxidases. Furthermore, APX's independence from calcium ions for catalytic activity enhances its adaptability to diverse physiological conditions, including those characterized by calcium deficiency or reducing environments [46,47]. These features

suggest an evolutionary advantage, enabling APX to maintain an efficient intracellular trafficking and function in varied cellular contexts.

4. Catalytic Mechanism of APX

The successful expression of APX enabled a large-scale production, facilitating purification and crystallographic studies that unveiled complex details of its three-dimensional structure and catalytic mechanisms [18,47]. A defining feature of APX is its dual substrate-binding capability: one site interacts with its physiological substrate, ascorbic acid, while the other binds non-physiological aromatic compounds [48,49].

The primary site, near the γ -edge of the heme, binds L-ascorbate via specific interactions with Arg172, Lys30, and the heme 6-propionate. A second spatially separate site accommodates aromatic substrates, likely near the δ -meso carbon, as indicated by the structural data with salicylhydroxamic acid. Notably, mutations at Arg172 or Lys30 impair ascorbate oxidation but do not affect the activity toward aromatic compounds, confirming that these sites are structurally independent and functionally specialized [50].

The active site of APX and its immediate environment are characterized by conserved structural features typical of the peroxidase superfamily. In all structurally characterized peroxidases, the proximal His163 and Asp208 adopt conserved positions, forming the canonical Asp–His–Fe triad, in which the heme iron is coordinated by His163, whose non-coordinating N δ atom hydrogen bonds to a neighboring aspartate. This Asp–His–Fe triad is a defining structural motif of the peroxidase superfamily and has traditionally been considered indispensable for catalysis [18,49]. By contrast, a proximal Trp179 is unique to cytochrome c peroxidase (CcP) and APX, whereas most other peroxidases possess phenylalanine at this position. In APX, on the distal face, the iron ligand is flanked by a hydrogen-bonding Trp41, alongside His42 and Arg38, which interact with the oxo group via bridging water molecules and contribute to its stabilization during catalysis [49,51] (Figure 1).

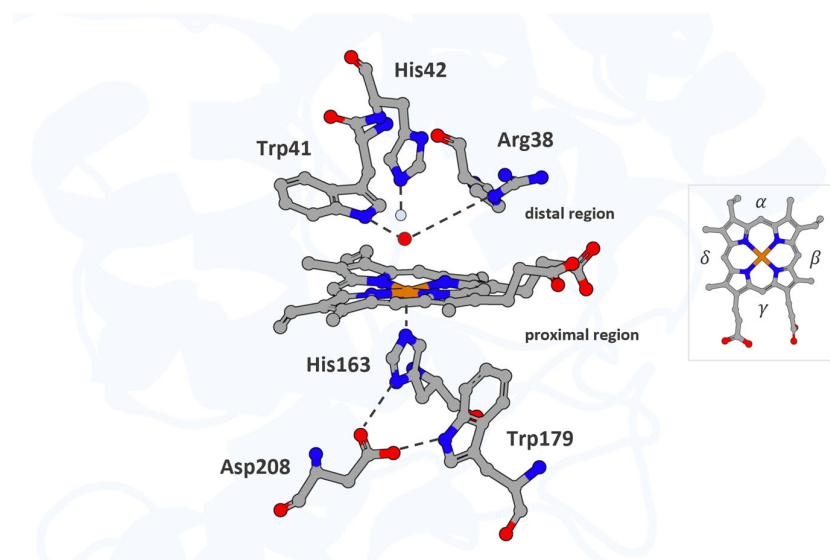


Figure 1. The active site of APX. The heme cofactor and the residues His163, Trp179, and Asp208 in the proximal region, along with His42, Trp41, and Arg38 in the distal region, are shown as atom-colored sticks (iron, carbon, nitrogen, and oxygen colored in orange, gray, blue, and red, respectively). Waters are represented in the light blue sphere, and ferryl oxygen occupies the distal pocket and coordinates the heme iron. Hydrogen bonds are indicated by dotted lines. The heme periphery is annotated to indicate the α -, β -, γ -, and δ -edges. Structural mapping is based on the Protein Data Bank entry 1OAG (PDB_00001OAG).

The catalytic mechanism of APX involves a conserved sequence of redox transitions mediated through transient, high-valent iron–oxo intermediates that drive the stepwise oxidation of electron-donating substrates. In the catalytic cycle, the first intermediate form is Compound I, a highly oxidized species resulting from the two-electron, two-proton transfer from hydrogen peroxide to the ferric Fe (III) heme ion [49,52,53]. Structurally, unlike in other peroxidases where a tryptophan residue is oxidized to form a cationic radical, the oxidation in APX occurs at the δ -edge of the heme macrocycle, resulting in a ferryl heme Fe (IV)=O coupled to a porphyrin π -cation radical (Por $^{\bullet+}$), more precisely described as Fe (IV)–L $^{\bullet}$. (Figure 2, Step 1). Compound I acts as the primary oxidant, initiating electron transfer from the substrate to the enzyme's active site [14,52–55].

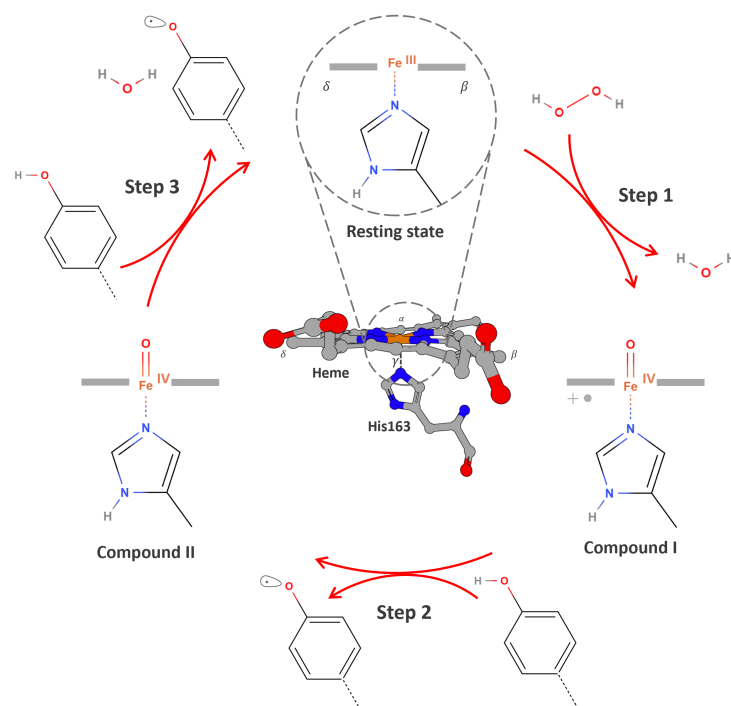


Figure 2. An overview of the catalytic cycle of APX. Step 1: The resting ferric enzyme Fe (III) reacts with hydrogen peroxide to generate Compound I, a high-valent iron–oxo intermediate consisting of an Fe (IV) = O center and a porphyrin-centered radical Fe (IV) = O/Por $^{\bullet+}$. Step 2: A phenolic substrate (e.g., guaiacol, biotin-tyramide) binds near the solvent-exposed δ -edge of the heme and donates one electron and one proton to Compound I. This results in the formation of a phenoxyl radical and Compound II Fe (IV) = O, which lacks the porphyrin radical. The substrate radical is then released into the surrounding environment. Step 3: A second equivalent of the phenolic substrate undergoes the same process, donating an electron and proton to reduce Compound II, generating a second phenoxyl radical and regenerating the enzyme in its resting Fe (III) state, thereby completing the catalytic cycle.

The one-electron reduction of Compound I by a substrate yields Compound II, which retains the ferryl heme moiety Fe (IV)=O but lacks the porphyrin-centered radical (Figure 2, Step 2). Compound II is reduced back to the resting state via a second electron transfer from a substrate (Figure 2, Step 3) [52,54,56–58].

Compound III is another intermediate that can form in some peroxidases, particularly under excess hydrogen peroxide, and is frequently associated with enzymatic inactivation, “suicide inactivation”, as evidenced by kinetic studies; however, detailed structural or mechanistic information in APX has not yet been reported [14].

Kinetic assays using guaiacol as a model substrate demonstrated its oxidation into tetraguaiacol, enabling precise measurements of the initial velocity, catalytic turnover,

and substrate affinity [14,50]. Nonetheless, two inhibitory mechanisms were identified: a reversible inhibition at moderately high hydrogen peroxide levels and an irreversible inactivation accumulating over prolonged catalytic cycles [12,14]. These findings underscore limitations in long-term stability, despite the optimal activity under standard conditions.

Beyond their catalytic role, certain isoforms exhibit a dual substrate specificity, oxidizing both ascorbate and glutathione. This versatility enhances plants' resilience to abiotic stressors, such as heat and salinity, by broadening the antioxidant capacity [59].

5. Engineering APX

The identification of the first cDNA encoding APX by Mittler and Zilinskas marked a decisive advance in the study of this enzyme family [60]. This breakthrough enabled the cloning and expression of multiple APX genes, providing the basis for comprehensive structural and functional analyses. Early heterologous expression studies of cytosolic APX isoenzymes from peas and soybeans in *E. coli* provided their catalytic properties and physiological roles in plants [47,61–63]. These initial studies laid the foundation for subsequent biochemical characterizations, enabling systematic comparisons across isoforms and species.

An unexpected discovery arose with the isolation of APX enzymes from bovine eyes [64]. This finding revealed that APX functions are not confined to plants, significantly broadening their research scope and suggesting a role in mammalian physiology, where it may contribute to the oxidative stress regulation across diverse biological systems.

In 2012, Alice Ting's group introduced a genetically engineered version of APX, derived from *Glycine max*, as a reporter for electron microscopy (EM) applications [12]. This innovative approach engineered APEX (E for engineered) to catalyze the oxidation of 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) in the presence of hydrogen peroxide, initiating a polymerization reaction that produces indamine or phenazine products that form an insoluble brown precipitate. These products, upon forming complexes with osmium tetroxide, enable high-resolution imaging with an exceptional contrast (Figure 3) [65–69].

In mammalian cells, the utility of APEX is demonstrated through its fusion to target proteins, followed by a fixation with glutaraldehyde and incubation with diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide, triggering the rapid polymerization of DAB, enabling a high-resolution visualization while preserving native cellular structures. Unlike conventional EM contrast methods, which often rely on light activation or antibody-based tagging and can introduce significant structural artifacts, APEX operates under mild labeling conditions. Its enzymatic specificity and the localized nature of DAB polymerization minimize perturbations to the cellular architecture, maintaining structural integrity close to the physiological state. Furthermore, the Ting group extended APEX's versatility by utilizing it for biotin-tyramide mediated protein proximity labeling in live cells [70].

The evolutionary trajectory of APEX variants—from the wild-type enzyme to the engineered forms APEX, APEX2, and APEX3—exemplifies the power of structural and functional optimization in enzyme engineering for biological applications. The cytosolic form of wild-type APX assembles into a noncovalent homodimer stabilized by ionic interactions, as seen in pea cytosolic APX structures [18]. While this dimerization is integral to its physiological function, it significantly impairs the enzyme's stability and utility in proximity labeling experiments under cellular conditions.

These limitations were addressed through directed evolution and rational mutagenesis, leading to the development of APEX. Engineered via a yeast display evolution, monomeric APEX retained the core α -helical fold while incorporating key mutations—K14D and E112K, which reduced dimerization, and W41F, which restored the catalytic activity (Figure 4, highlighted in gray) [12,71]. Further improvements were achieved with

the introduction of the A134P mutation, enhancing the catalytic efficiency, thermal stability, heme-binding affinity, and hydrogen peroxide tolerance in the optimized variant APEX2 (Figure 4, highlighted in purple) [14].

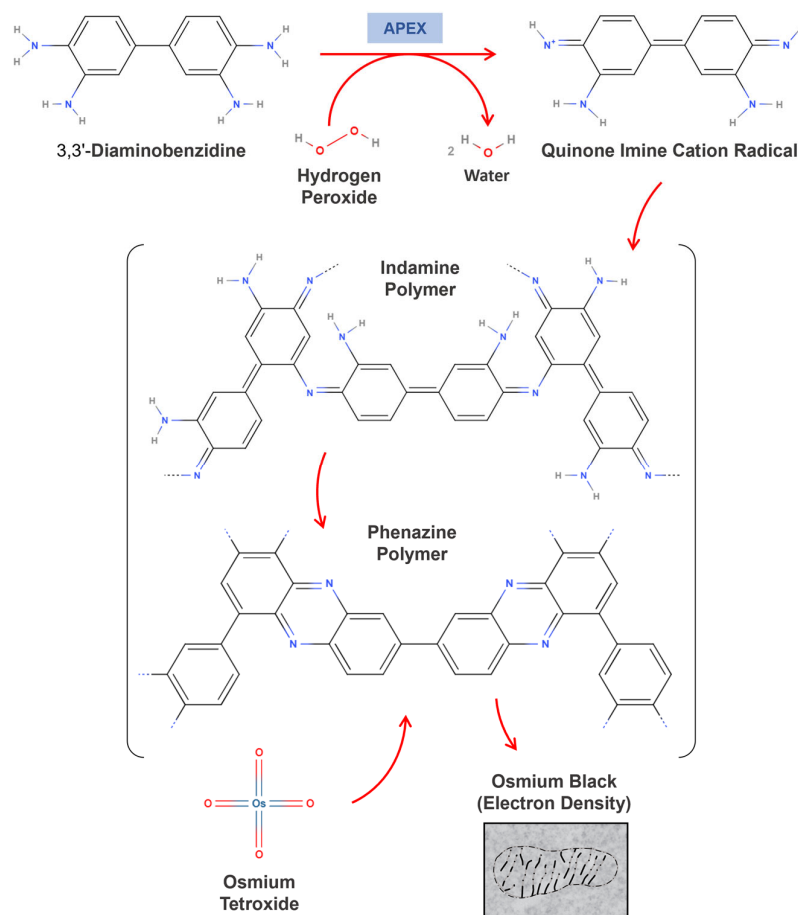


Figure 3. The enzyme-catalyzed DAB polymerization mechanism. The figure presents a hypothetical mechanism for the polymerization of 3,3'-Diaminobenzidine catalyzed by the iron porphyrin enzyme, leading to the formation of indamine or phenazine coupling products. These products contain primary aromatic amino groups, enabling them to react with osmium tetroxide. Additionally, the indamine polymer may undergo cyclization to form the phenazine polymer.

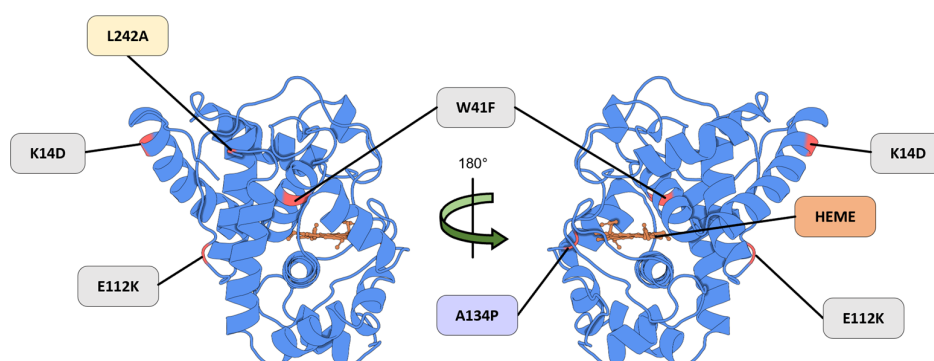


Figure 4. A representation of the APEX mutation strategy. The K14D and E112K mutations were introduced into APEX to reduce dimerization, while the W41F mutation restored catalytic activity (Gray). The APEX2 variant incorporates an additional A134P substitution (Purple), which confers an enhanced catalytic efficiency. The APEX3 variant includes the L242A mutation (Yellow), resulting in an improved nuclear localization relative to APEX2. The heme cofactor (Orange) is required for redox activity. Structural mapping is based on the Protein Data Bank entry 5L86 (PDB_00005L86).

Structural studies of APEX2 suggest that specific mutations optimize the heme microenvironment and enhance substrate accessibility, markedly improving the enzymatic performance in complex cellular contexts. Critically, APEX2 functions as a monomer, which is an essential feature for maintaining the proper folding and activity within the reducing conditions of the cytosol, where dimeric variants often misfold or become inactive. Furthermore, the overexpression of dimeric APEX can lead to organelle aggregation, particularly in mitochondria and the endoplasmic reticulum, thereby disrupting the cellular architecture. The engineered monomeric configuration circumvents these issues, supporting a high catalytic activity even at low expression levels while minimizing cytotoxicity [72,73].

Building upon these optimizations, the substitution of the canonical axial histidine with a genetically encoded N δ -methyl histidine (NMH) in APEX2 enhanced the resistance to irreversible inactivation while preserving catalytic efficiency. Notably, despite the absence of the conserved hydrogen-bonding interaction traditionally deemed essential for activity, APEX2-NMH exhibited a five-fold higher total turnover number while maintaining a comparable or slightly improved catalytic performance [74].

Nonetheless, early variants of APEX2 displayed a cytoplasmic localization bias, primarily due to hydrophobic residues within the nuclear export signal (NES) regions. Although substitutions within these regions reduced this bias, they also compromised labeling efficiency.

To overcome this trade-off, the APEX2-L242A mutant—designated APEX3—was developed (Figure 4, highlighted in yellow) [75]. This variant successfully retained the peroxide-dependent labeling activity while minimizing the cytoplasmic retention. APEX3 integrates the catalytic advantages of APEX2 while eliminating cytoplasm-biased localization, positioning it as a powerful tool for applications requiring a spatially confined proteomic analysis within the nucleus [75].

The choice of an APEX variant is guided by the experimental objectives and methodological requirements of each study. APEX2 was engineered to enhance the catalytic performance, particularly by reducing the sensitivity to hydrogen peroxide. APEX3 was subsequently optimized for whole-cell distribution, avoiding cytoplasm-biased localization and extending its applicability to studies of the nuclear proteome. Therefore, the selection of an appropriate APEX variant depends on the specific biological context and research question, with APEX2 offering an improved catalytic efficiency and APEX3 enabling effective nuclear targeting.

To further expand APEX versatility, split-APEX technology was introduced. This innovation divided the enzyme into inactive N-terminal and C-terminal fragments that regained peroxidase activity upon their recombination during molecular interactions, with a focus on the specific and precise targeting of protein–protein interactions, RNA–protein interactions, and organelle contact sites. Split-APEX has been applied to mammalian cell membranes, noncoding RNA scaffolds, and mitochondria-associated endoplasmic reticulum contact sites [76,77]. Additional advancements, such as the development of a cysteine-free mutant, further stabilized APEX2-tagged proteins, optimizing their performance in diverse experimental contexts [78].

6. High-Resolution Mapping with APEX

The versatility of APEX arises from its ability to generate free radicals through the oxidation of diverse aromatic substrates, a process that can be chemically modulated to enhance reactivity and specificity. Notably, APEX oxidizes substrates as varied as DAB for electron microscopy (EM) contrasts, guaiacol for colorimetric assays, AmplexTM Red for fluorometric detection, and a variety of biotins and other substrates (Table 1). Interestingly, APEX catalyzes the oxidation of aromatic compounds—traditionally processed by Class III peroxidases—at rates comparable to ascorbic acid oxidation [46,79,80]. The substrate

promiscuity of APEX can be attributed to its wide binding pocket and high oxidation potential of 1.16 V [52], which allows it to effectively catalyze the oxidation of a diverse range of substrates. These features are fundamental for biochemical assays and cellular labeling applications.

Table 1. Overview of substrates targeted by APEX for biochemical applications.

Substrates	Molecular Formula	CAS Registry Number	References
Hydrogen Peroxide	H ₂ O ₂	7722-84-1	[62]
Ascorbic Acid	C ₆ H ₈ O ₆	50-81-7	[62]
Guaiacol	C ₇ H ₈ O ₂	90-05-1	[50,62,78]
Pyrogallol	C ₆ H ₆ O ₃	87-66-1	[62]
P-Cresol	C ₇ H ₈ O	106-44-5	[50,81]
o-Dianisidine	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	119-90-4	[82]
Salicylhydroxamic acid	C ₇ H ₇ NO ₃	89-73-6	[50]
3,3'-Diaminobenzidine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄	91-95-2	[83]
Amplex™ Red	C ₁₄ H ₁₁ NO ₄	119171-73-2	[12,84]
Biotin-tyramide / Biotin-phenol	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₃ S	41994-02-9	[70]
Biotin-LC-LC-tyramide (BxxP)	C ₃₀ H ₄₇ N ₅ O ₅ S	851113-28-5	[85]
Desthiobiotin-Phenol	C ₁₈ H ₂₇ N ₃ O ₃	2242902-55-0	[86]
Adamantane-Phenol	C ₂₄ H ₃₆ N ₂ O ₄	–	[87]
Biotin-Aniline	C ₁₈ H ₂₆ N ₄ O ₂ S	769933-15-5	[88]
Biotin-Naphthylamine	C ₂₃ H ₃₀ N ₄ O ₂ S	2375201-60-6	[88,89]
Alkyne tyramide/Alkyne-phenol	C ₁₃ H ₁₅ NO ₂	1694495-59-4	[90]

Concerning proteome applications, engineered APEX mediates the oxidation of the most common substrate, biotin-tyramide (also known as biotin-phenol), in the presence of hydrogen peroxide. This reaction generates biotin-phenoxyl radicals, which covalently bind to electron-rich amino acids, including tyrosine, tryptophan, and cysteine [12,70]. These radicals exhibit a high reactivity, a short lifespan of <1 ms, and a limited tagging radius, initially estimated at approximately 20 nm [70]; however, recent evidence indicates a broader diffusion radius of 269 ± 41 nm [91]. Proteins labeled through this approach are purified using streptavidin-conjugated resin and identified by a liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS) [14,92]. This technique is advantageous because it bypasses dependencies on protein-protein interactions or organelle integrity post-labeling, enabling the precise mapping of protein interactomes (Figure 5).

This approach is particularly relevant in the context of proteoforms, as an alternative translation initiation and other post-translational modifications can generate isoforms with distinct subcellular localizations and functional properties [93]. Notably, the mislocalization of specific proteoforms has been implicated in various pathologies. In Alzheimer's disease, extracellular deposits of amyloid-β and intraneuronal accumulations of tau proteoforms are defining features, whereas the Lewy pathology of Parkinson's disease is characterized by intracellular inclusions of α-synuclein [94]. These findings underscore the critical need to map the distribution of proteoforms within cellular compartments, unravel some of the partner proteins, and thus infer different proteoform functionalities, a task that can only be achieved using high-precision proximity-dependent labeling techniques such as APEX.

The APEX-based proximity labeling technology has been introduced into proteomics in two main approaches: for organelle/structure proteome mapping [15,70,95–97] or for identifying protein-protein interactions [98–102] (Figure 6). In the first approach, APEX is fused to a targeting sequence that directs the enzyme to specific subcellular compartments. Once localized, APEX catalyzes the biotinylation of nearby proteins, enabling the detailed characterization of organelle proteomes. This method provides valuable insights into the composition and biological functions of these compartments.

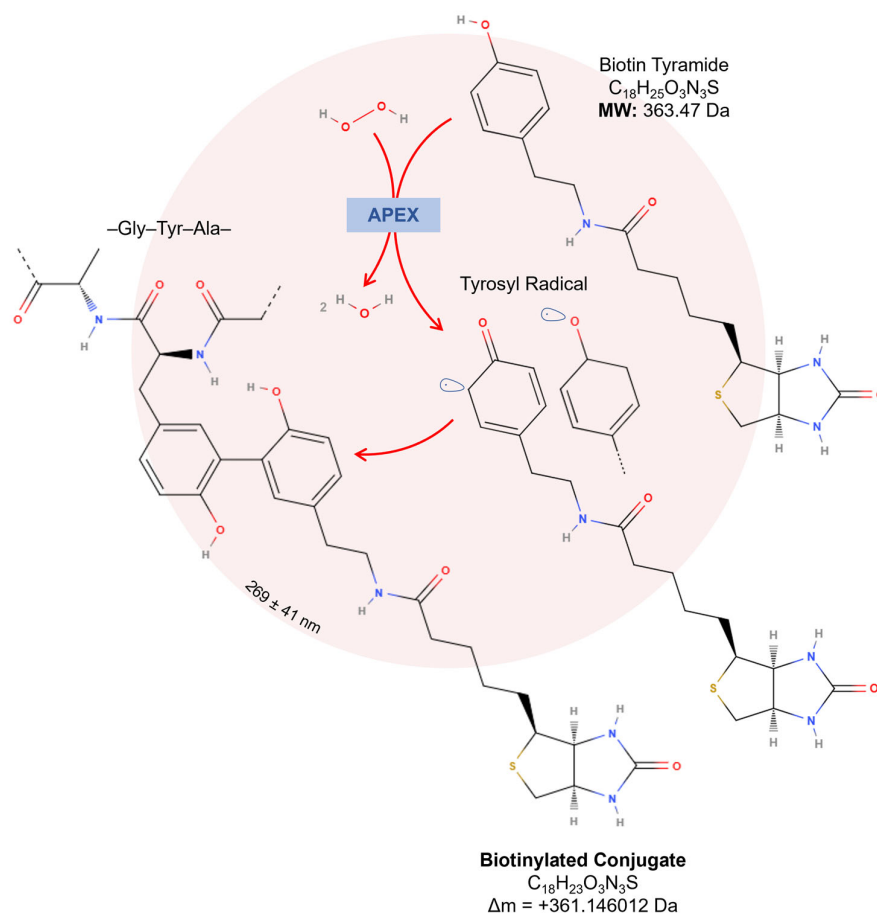


Figure 5. Proximity-dependent labeling using engineered APEX. In the presence of hydrogen peroxide, APEX oxidizes two biotin-tyramide/biotin-phenols, generating highly reactive biotin-phenoxyl radicals that covalently bind to nearby electron-rich amino acids, such as tyrosine, tryptophan, and cysteine. With a limited diffusion of 269 ± 41 nm, biotinylation occurs in a confined region, improving the spatial resolution and reducing nonspecific labeling.

In the second approach, APEX is fused to a protein of interest, where it remains active whether fused at the N-terminus or C-terminus [71]. This fusion facilitates the labeling and identification of interacting partners, supporting the construction of protein interaction networks. By mapping these interactions, researchers can advance their understanding of dynamic cellular processes and their underlying mechanisms.

Both approaches—episomal expression and genomic integration—can be employed to introduce APEX into cells. In episomal expression, APEX is delivered via plasmids, enabling a transient or stable expression without altering the genome [70]. In contrast, genomic integration, achieved through gene editing techniques, ensures a stable and long-term expression of APEX [102]. While episomal expression allows for flexible and rapid protein production, genomic integration provides more consistent expression levels, making it preferable for long-term studies. Once the APEX expression is established, its labeling capabilities facilitate advanced proteomic analyses, including both bottom-up and top-down approaches.

Following transfection and APEX expression, proteins within the cells undergo biotinylation during the culture. These biotinylated proteins are then purified using streptavidin affinity chromatography. To confirm the labeling efficiency and proper APEX localization, a validation is performed through Western blotting and immunofluorescence microscopy. Finally, the biotinylated proteins are identified and analyzed by mass spectrometry, enabling a comprehensive exploration of organelle proteomes and protein interaction networks [14,78].

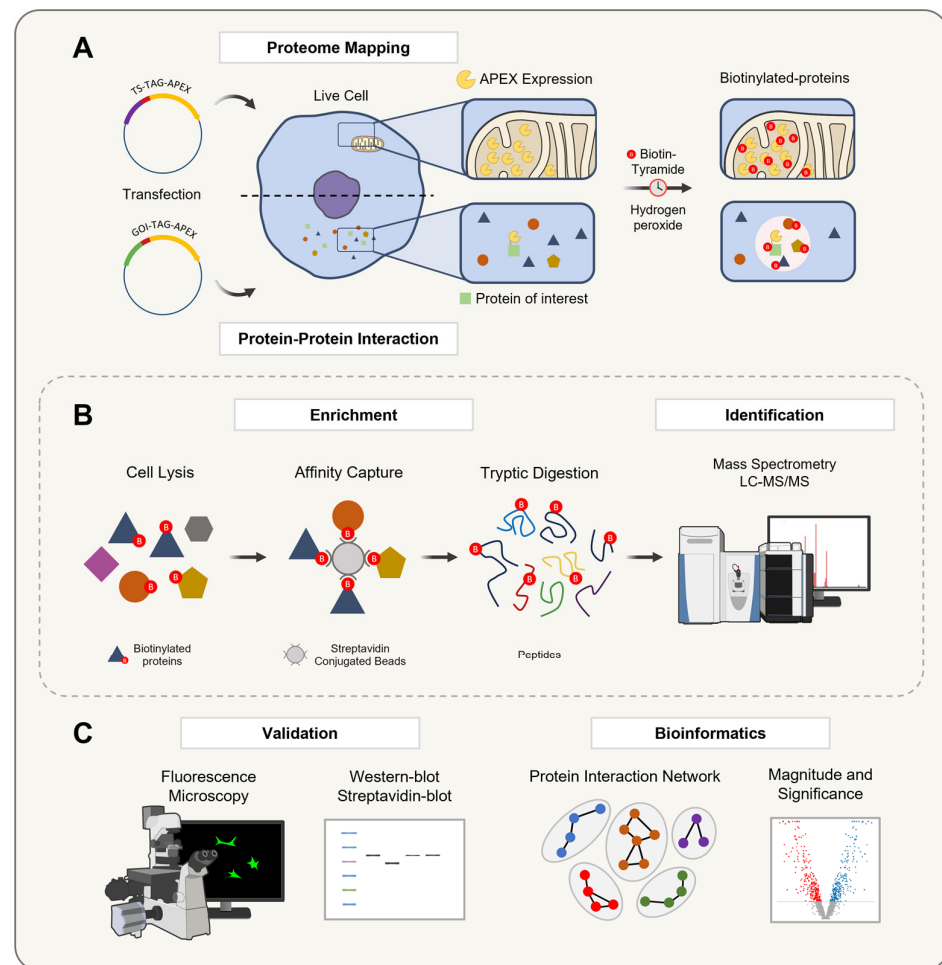


Figure 6. A schematic representation of the APEX technology workflow for organelle proteome mapping and protein–protein interaction studies. The workflow for APEX-mediated proximity labeling involves two primary approaches: **(A)** Targeting APEX to a specific organelle via a targeting sequence (TS) or fusing it to a gene of interest (GOI) to express a protein of interest. In the presence of hydrogen peroxide, APEX catalyzes the oxidation of biotin-tyramide into a short-lived biotin-phenoxyl radical, which mainly biotinylates tyrosine residues on nearby proteins in a proximity-dependent manner, reflecting the localization of the bait protein. **(B)** The biotinylated proteins are then enriched and purified by an affinity capture with a streptavidin pulldown assay, digested into peptides, and identified by LC-MS/MS to generate a comprehensive proximal proteome profile. **(C)** Finally, the biotinylation process is validated in living cells using Western blotting and fluorescence microscopy, followed by a specific data analysis to visualize and interpret results based on the experimental design, ensuring the robust identification and validation of protein–protein interactions within their native cellular context.

The versatility of APEX has enabled its broad application across diverse cellular and organismal systems, allowing for the detailed spatial and functional characterization of proteomes in various biological contexts. Enhanced APEX protocols have been instrumental in profiling proteomes across diverse subcellular compartments and cellular structures, including the mitochondria [15,70,103,104], primary cilia [105], endoplasmic reticulum [104,106], stress granules [107], and cellular dynamics signaling complexes [108,109]. Other applications include mapping glycoconjugate-binding proteins [110,111], ER-plasma membrane junctions [112], mitochondrial nucleoids [113], neuronal synapses [114], G-protein-coupled receptors [108,109], nuclear and nucleolar proteins [115], DNA damage response dynamics [115], histone modifications [116], and protein topology and localization in the mitochondrial matrix [86,117], endoplasmic reticulum [118], and extracellular vesicle exosome [72].

In this context, APEX-based strategies have also proven to be effective for determining the membrane protein orientation. CryoAPEX, which combines chemical fixation with high-pressure freezing and APEX tagging, enables the precise localization of membrane proteins while preserving the subcellular membrane architecture [106,119,120]. This method is compatible with electron tomography, facilitating the reconstruction of high-resolution three-dimensional maps of membrane proteins, such as the human FIC (filamentation induced by cAMP) protein and the endoplasmic reticulum single-pass membrane protein HYPE.

The versatility of APEX has enabled its integration into a wide array of experimental systems for subcellular proteomic profiling. Its robustness and ability to function in living cells have supported applications across diverse model organisms and pathogens. In human cells, APEX has been employed to map subcellular proteomes and investigate protein–protein interactions under physiological conditions [118]. In *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, it has facilitated the analysis of tissue-specific protein networks during development [44,121,122]. In parasitic protozoa, such as *Plasmodium falciparum*, APEX technology has advanced the characterization of specialized organelles—such as rhoptries—while in *Toxoplasma gondii*, it has been used to investigate mechanisms that inhibit necroptosis, a process crucial for long-term parasite persistence within tissue cysts during a chronic infection. These insights contribute to a deeper understanding of host–pathogen interactions. [102,123]. Similarly, in *Trypanosoma brucei*, this strategy has been used to elucidate the flagellar proteome [97]. In prokaryotic systems, such as *Mycobacterium tuberculosis*, APEX has enabled the identification of compartmentalized bacterial proteins relevant to virulence [124]. Additionally, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, it has proven to be effective for studying organelle-specific proteomes and dynamic protein localization during stress responses [96,125].

Beyond these established systems, APEX technology holds significant promise for expanding proximity labeling into other models. In *Danio rerio*, a transparent vertebrate model widely used in developmental biology, it could enable a high-resolution, cell-type-specific proteomic profiling during organogenesis and neurodevelopment [126]. In intracellular bacterial pathogens, such as *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* [127,128], APEX-based labeling may help reveal how these microbes modulate host cell proteomes, shedding light on mechanisms of bacterial virulence and host manipulation. Collectively, these diverse and emerging applications underscore the adaptability of this technology for dissecting complex biological processes across multiple experimental contexts.

Biotinylation as Post-Translational Modification (PTM)

Concerning biotin-tyramide, the main substrate used for APEX-based proteomic workflows, optimizing APEX labeling hinges on the accurate identification and thorough characterization of biotinylation sites, as this directly influences the precision and efficiency of downstream analyses. Tyrosine represents the predominant site of biotinylation, accounting for 98.5% of modifications, while minimal labeling is detected at other residues, such as tryptophan (0.5%) and cysteine (1%). In a mass spectrometry analysis, this biotinylation event corresponds to a mass shift of +361.146012 Da (Figure 5) [117]. However, the oxidation of the thioether group in biotin-tyramide probes can decrease the peptide signal intensity and complicate the identification of low-abundance or inefficiently labeled proteins. The oxidized peptide variant, with a delta mass of +377.146012 Da (Figure 7A), may exhibit up to ~20% of the signal intensity of non-oxidized peptides in human cells [86].

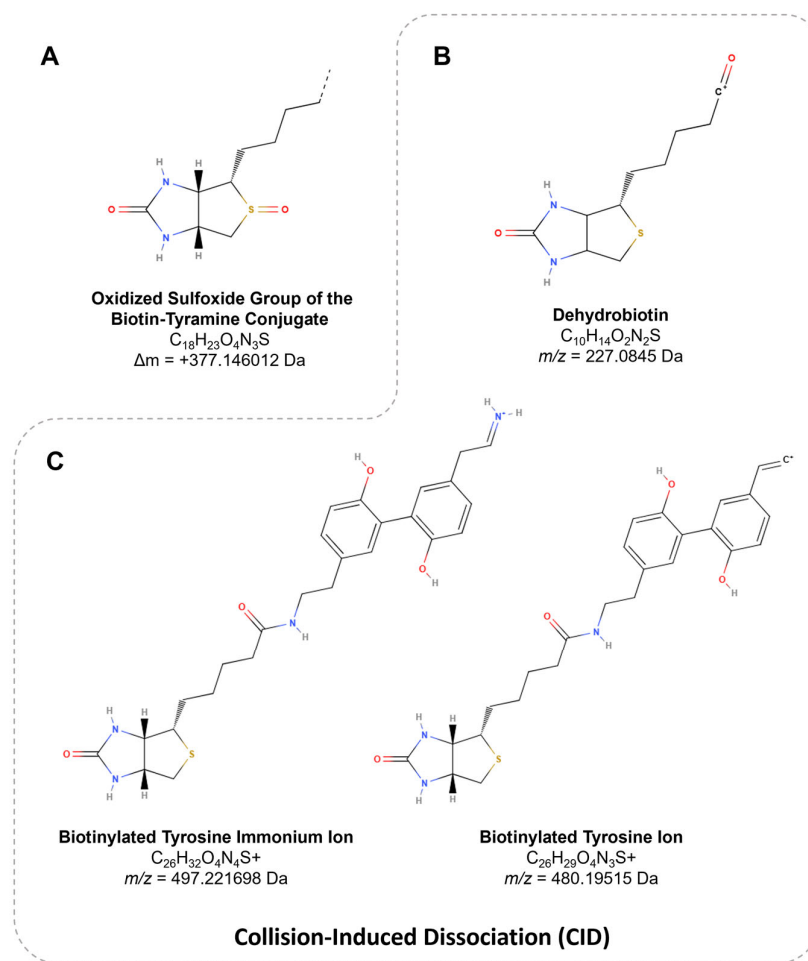


Figure 7. The structure of biotin derivatives. (A) The variation in the oxidized sulfoxide group of biotin-tyramide, resulting in a mass shift of +377.146012 Da. (B) The m/z value of 227.0845 corresponds to dehydrobiotin, a product ion specific to biotin. (C) The m/z values of 497.221698 (immonium ion) and 480.19515 (immonium-related ion) represent characteristic ions associated with biotinylated tyrosine.

Peptides harboring PTMs, such as biotinylation, produce characteristic fragment ions upon collision-induced dissociation (CID), including dehydrobiotin at m/z 227.0845 (Figure 7B), identified in biotin-tyramide [129] and Sulfo-NHS-LC-Biotin conjugates [130]. Additionally, biotinylated peptides generate ions uniquely associated with biotinylated tyrosine, such as the immonium ion at m/z 497.221698 and a related ion at m/z 480.19515 (Figure 7C). The presence of these ions collectively contributes to an 11–12% increase in the peptide detection sensitivity [117,131].

To further enhance the utility of these findings, the data have been integrated into proteomic analysis software, such as PatternLab V, which aids researchers in the biological interpretation of APEX-based experiments [132,133]. Alternatively, fragmented ions can be manually analyzed regardless of the software used [102]. Overall, these features of biotin-tyramide as a PTM should be considered when using APEX technology, which facilitate peptide identification, improve PTM site localization accuracy, and support the optimization of analytical strategies [134]. Databases such as Unimod [135], a comprehensive repository of protein modifications for mass spectrometry, provide experimentally validated mass values based on elemental compositions. These data allow for the precise determination of mass shifts arising from both natural and artificial modifications, thereby facilitating a more accurate interpretation of mass spectrometry results.

7. APEX Technology to Study DNA and RNA

Beyond its applications in proteomic labeling, APEX has emerged as a versatile tool for targeting diverse biomolecules, including RNA and DNA. A pivotal development in this field was the introduction of APEX-seq in 2019 by Fazal and colleagues (Figure 8A). This technique leverages the reactivity of biotin-tyramide radicals with RNA guanosine residues to enable subcellular transcriptome profiling. By employing APEX2, biotinylated RNAs are isolated through a streptavidin-based purification, facilitating the capture of RNAs proximal to specific proteins [136,137]. Subsequent innovations, such as the development of biotin-tyramide derivatives including biotin-aniline and biotin-naphthylamine (Table 1), have further enhanced the efficiency of RNA and DNA labeling, respectively [88]. These advancements have significantly expanded APEX's utility, enabling more precise and detailed subcellular explorations.

Recent innovations in APEX substrates have further enhanced their capabilities. For instance, alkyne-phenol has emerged as a novel substrate, demonstrating a 94% specificity and improved labeling efficiency in yeast mitochondria compared to traditional biotin-tyramide [90]. Similarly, biotin-aniline has enabled the characterization of the mitochondrial matrix transcriptome and confirmed the presence of glycan-conjugated RNA on cell surfaces [138]. These substrate advancements have refined the precision and versatility of APEX, paving the way for more detailed investigations into molecular interactions and cellular dynamics.

Extending the application of APEX to the study of DNA-associated proteomes, the dCas9-APEX2 system has been adapted to map DNA-associated proteomes through restricted spatial tagging, a method termed the chromatin-based enzymatic reporter for specific tagging (C-BERST) (Figure 8B). In initial applications, telomeres and centromeres were targeted, enabling the specific profiling of their subnuclear proteomes [139]. In parallel, an alternative strategy known as genomic locus proteomics (GLoPro) was introduced to investigate non-repetitive single loci [140]. This approach involved the design and expression of five distinct sgRNAs tiling the same genomic region across separate HEK293T cell lines. By integrating the resulting datasets, shared background signals were effectively filtered out, thereby enhancing the locus specificity. To mitigate artifacts arising from the constitutive expression of dCas9-APEX2, an inducible promoter system was employed to finely regulate expression levels.

A novel APEX2-based proximity labeling strategy was developed to map protein interactions with mitochondrial DNA G-quadruplexes in living cells, overcoming the limitations of traditional approaches lacking subcellular specificity. This method enabled the identification of several mtDNA G4-binding proteins, including DHX30, a previously uncharacterized helicase shown to localize to both the cytoplasm and mitochondria. DHX30 resolves mtDNA G4 structures, and its activity was found to reduce the glycolytic metabolism in tumor cells—an effect reversed by the G4 stabilizer RHPS4 [141].

Building on these breakthroughs, APEX-RIP (RNA Immunoprecipitation) (Figure 8C) integrates the proximity biotinylation by APEX with RNA Immunoprecipitation to directly capture and identify RNAs within distinct subcellular compartments. This method employs formaldehyde cross-linking to preserve RNA localization patterns, offering an exceptional specificity and sensitivity. As a result, APEX-RIP overcomes the limitations of traditional fractionation methods, providing a robust platform for studying RNA dynamics [142].

In a complementary approach, Proximity-CLIP (Figure 8C) integrates APEX-mediated biotinylation with UV-induced cross-linking in the presence of 4-thiouridine (4SU) to enable the profiling of RNA-binding proteins and their associated RNAs. This technique maps regulatory interactions within critical cellular compartments, such as the nucleus, cytoplasm, and cell junctions, offering a comprehensive view of RNA-protein interactions [143,144].

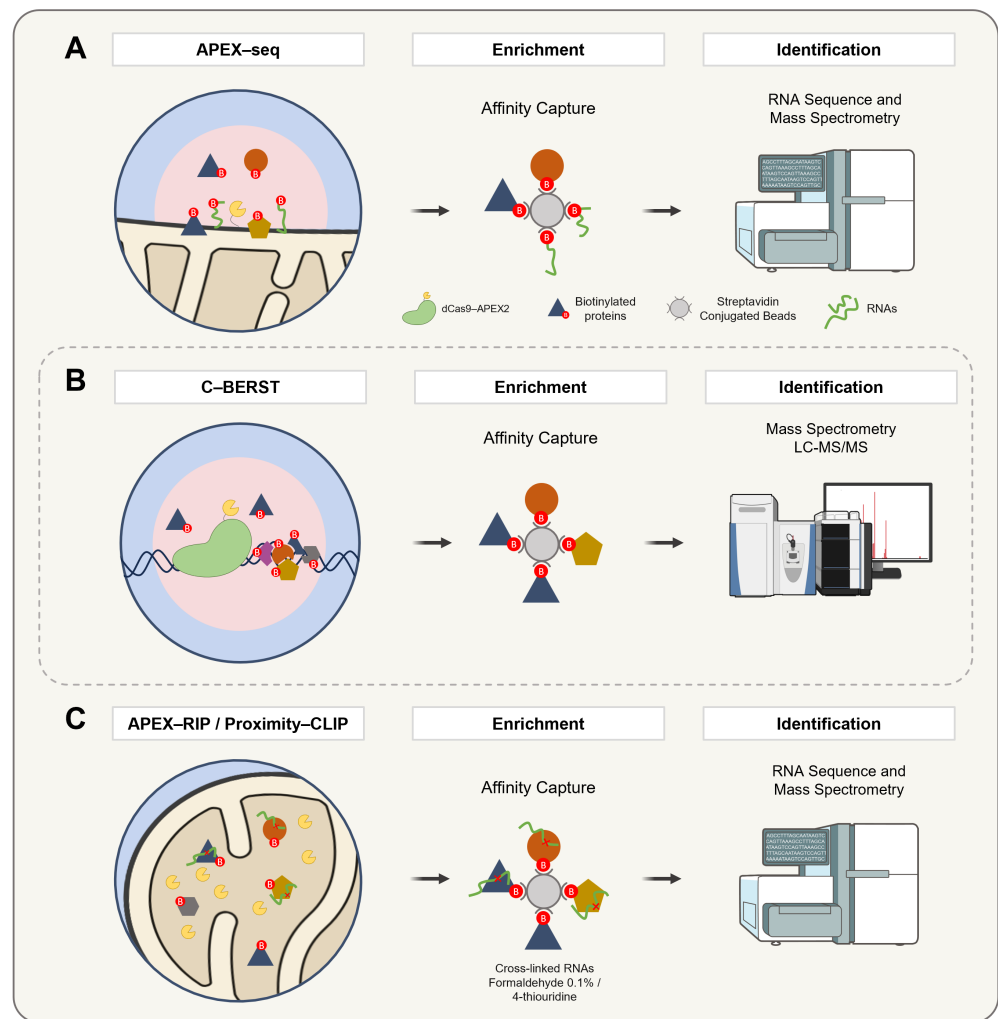


Figure 8. A schematic representation of APEX2-based methodologies for the spatially resolved identification of protein, DNA, and RNA interactomes. **(A)** APEX-seq enables spatial RNA mapping by targeting APEX2 to specific subcellular compartments, where biotin-phenol and hydrogen peroxide induce the selective biotinylation of nearby RNAs. These are captured with streptavidin beads, enriched via poly(A) selection, and analyzed by RNA sequencing. **(B)** C-BERST employs a fusion construct comprising catalytically inactive Cas9 (dCas9) and APEX2. The complex is guided to specific genomic loci (e.g., telomeres or centromeres) via single-guide RNAs. Upon the addition of biotin-phenol and hydrogen peroxide, APEX2 catalyzes the generation of biotin-phenoxyl radicals that covalently label proteins in the vicinity. The biotinylated proteins are subsequently enriched via a streptavidin affinity purification and identified by mass spectrometry. **(C)** APEX-RIP and Proximity-CLIP combine proximity biotinylation with RNA capture for transcriptome profiling. In APEX-RIP, cells expressing compartment-targeted APEX2 are exposed to biotin-phenol and hydrogen peroxide, followed by cross-linking with 0.1% formaldehyde to stabilize protein–RNA interactions. Biotinylated complexes are purified by the streptavidin pull-down, and co-purified RNAs are analyzed by qRT-PCR or RNA-seq. Proximity-CLIP further enhances the spatial and molecular resolution by incorporating the 4-thiouridine labeling of nascent RNAs. After APEX2 labeling in the presence of biotin-phenol and hydrogen peroxide, cells are subjected to UV irradiation ($\lambda > 312$ nm) to induce covalent cross-linking between proteins and RNAs. Lysates are then processed for a streptavidin-based enrichment, and associated RNAs are identified by RNA-seq, providing high-resolution maps of localized ribonucleoprotein complexes.

Further expanding the scope of APEX applications, a study introduced two innovative strategies, applying APEX proximity labeling using complementary approaches to target human telomerase RNA (hTR). The first approach involved conjugating hTR to the bac-

terioophage MS2 RNA stem–loop, which specifically binds to an MS2 coat protein-fused APEX2 (MCP-APEX2). The second approach utilized a catalytically inactive Cas13-APEX2 fusion (dCas13-APEX2), programmed by a guide RNA (gRNA) to target unmodified hTR. These methods enabled the tagging of endogenous proteins in the vicinity of specific RNAs for a subsequent identification by mass spectrometry. When applied to hTR, this approach successfully identified known interaction partners as well as unexpected hits, including an enzyme responsible for RNA post-transcriptional modifications that influence telomerase activity [145]. Building on this strategy, a subsequent study employed dCas13d-APEX2 to map cell cycle-dependent interactors of the FAS1 mRNA, which encodes the β subunit of fatty acid synthase in yeast. This analysis revealed that the glycolytic enzyme Tdh3p binds to FAS1 mRNA and is essential for the periodic expression of the Fas1p protein, thereby uncovering a direct link between metabolic regulation and the RNA-mediated control of gene expression [146]. Altogether, these studies collectively demonstrate the versatility of APEX in addressing diverse biological questions, from mapping RNA–protein interactions to visualizing RNA dynamics in situ. These developments highlight APEX’s potential for studying the spatial and functional dynamics of the transcriptome and proteome in living cells.

Expanding methodological capabilities, the combination of APEX with the organic–aqueous phase separation of cross-linked protein–RNA complexes (APEX-PS) enables the selective enrichment of RNA-binding proteins from specific subcellular compartments. This approach revealed novel proteins localized to the nucleus, nucleolus, and outer mitochondrial membrane [147].

The advancements in APEX-based proximity labeling for studying protein–ligand interactions are summarized in Figure 9, while Table 2 presents the diverse methodologies enabled by APEX technology in proteomics and genomics.

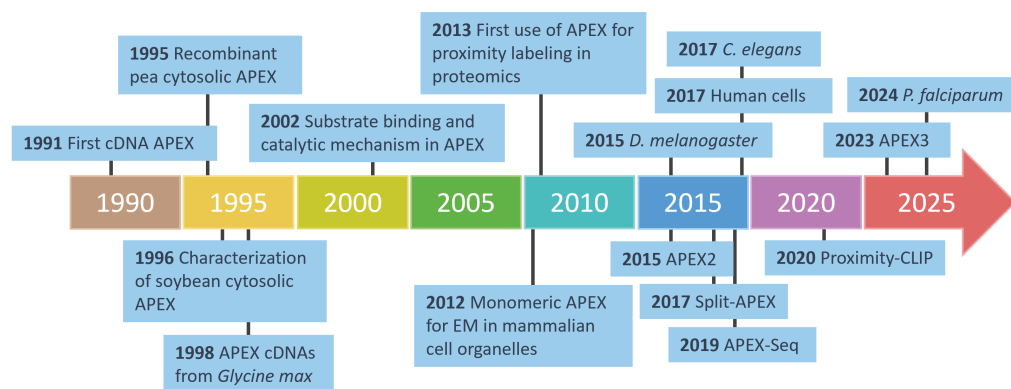


Figure 9. The development of APEX technology in proteomics and biological applications. This timeline highlights key milestones in the development of APEX technology, from its initial discovery in 1991 to its evolution into advanced tools such as APEX2, APEX3, and split-APEX. Over the years, APEX has been adapted for diverse applications, including electron microscopy (EM), proximity labeling, and proteomics, across various model organisms such as *C. elegans*, *D. melanogaster*, *P. falciparum*, and human cells. Innovations like APEX-Seq further demonstrate their versatility in mapping RNA interactions and cellular structures with a high precision.

Table 2. Applications of APEX proximity labeling in biological research.

	Method/Strategy	Biological Question Addressed	Reference
Organelle Mapping	Mitochondria-targeted APEX-catalyzed proximity labeling	Comprehensive proteomic mapping of mitochondrial compartments	[70]
	Mapping Intermembrane space-selective APEX biotinylation	Profiling mitochondrial intermembrane space proteome	[103]
	APEX2-directed evolution for enhanced subcellular proteomics	Improved labeling efficiency for organelle-resolved proteomic studies	[14]
	APEX2 proximity proteomics in <i>Trypanosoma brucei</i> flagellum	Resolving proteome composition of flagellum subdomains	[97]
	APEX-based proximity labeling in <i>Plasmodium</i>	Identification of microneme proteins in <i>Plasmodium berghei</i> ookinetes	[148]
Protein-Protein Interactions	Multidimensional proximity labeling of GPCR complexes with APEX2	Tracking transient signaling networks	[108]
	APEX2-mediated proximity labeling in <i>Plasmodium falciparum</i> infected erythrocytes	Identification of KAHRP interactors	[102]
	CRISPR/Cas9 genome editing and APEX2	Study of native protein–protein interactions in live <i>Drosophila</i> ovary tissue	[121]
Protein-RNA Interactions	APEX-RIP (RNA Immunoprecipitation) approach	Mapping RNAs localized to specific proteins or compartments	[142]
	Proximity-CLIP combines APEX biotinylation with UV-induced cross-linking	Maps regulatory interactions within critical cellular compartments	
	APEX-Seq (APEX-catalyzed RNA biotinylation and sequencing)	Subcellular transcriptome profiling with spatial resolution	[136]
	dCas13-APEX2 by a guide RNA to target unmodified hTR	Tagging of endogenous proteins	[145]
	dCas13d-APEX2 fusion targeting FAS1 mRNA	Identification of mRNA-specific interacting proteins	[146]
	Spatially resolved proteomics using optimized APEX2	High-resolution mapping of cellular microdomains	[147]
Protein-DNA Interactions	APEX2 fusion targeting nuclear lamina and DNA-associated proteins	Mapping nuclear DNA–protein interaction landscapes	[100]
	dCas9-APEX2 adapted to DNA-associated proteins	Specific profiling of subnuclear proteomes of telomeres and centromeres	[140]
	Proximity labeling of mitochondrial DNA G-quadruplex interactors	Identification of G4-binding proteins in mitochondrial DNA	[141]

8. Advantages and Challenges

The remarkable diversity of proteoforms contributes to the profound complexity of cellular proteomes [149], supports intricate molecular interaction networks [150], and presents significant analytical challenges [151]. In this context, APEX offers significant advantages over conventional protein interaction methods, including yeast two-hybrid (Y2H) [152] and co-immunoprecipitation (Co-IP) [153]. Unlike these conventional techniques, APEX operates in situ, preserving interactions within their native cellular environment [154]. While Y2H relies on protein activity reconstitution in yeast, which may not reflect native conditions and Co-IP is prone to protein complex dissociation during lysis, APEX overcomes these limitations by enabling a real-time interaction detection in living cells [15]. This in situ capability significantly enhances the reliability of APEX for studying dynamic cellular processes [14].

APEX also excels in spatial resolution by reducing the risk of diffusion beyond the target labeling area. Notably, APEX is particularly advantageous in bacterial systems, as it does not depend on cytoplasmic metabolites like ATP, which are absent in the bacterial periplasm [155]. This feature enhances its applicability in diverse biological contexts.

For the application of the APEX system in the study of transient or weak protein–protein interactions, combining APEX with chemical cross-linking agents, such as formalde-

hyde, enables the stabilization of ephemeral interactions prior to biotinylation. This dual strategy facilitates the capture of short-lived complexes that might otherwise dissociate during the labeling process [156]. Alternatively, fusing APEX to compartment-specific nanobodies restricts the biotinylation to targeted subcellular regions, thereby enhancing the spatial precision of the labeling [157]. Moreover, a notable strength of APEX is its compatibility with correlative light–electron microscopy (CLEM) [158], allowing the integration of molecular interaction data with the ultrastructural context. This integration provides a more comprehensive understanding of cellular processes by bridging molecular and structural biology.

Lastly, APEX's compatibility with advanced imaging modalities, including electron microscopy, underscores its utility in high-resolution studies [159]. The enzyme's ability to generate free radicals that covalently bind to proximal proteins ensures a high specificity and spatial precision, which are critical for detailed proteomic mapping. These attributes establish APEX as a cornerstone technology in cellular and molecular biology, driving innovation and discovery in the field.

One of the greatest challenges in APEX technology is the elution of biotinylated proteins/peptides. The interaction between biotin and streptavidin is extremely strong ($K_d \sim 10^{-15}$ M) [129,160], which complicates the enrichment of biotinylated proteins/peptides [15]. Factors such as the use of excessive streptavidin-coated beads or insufficient washing steps can lead to nonspecific binding, reducing the efficiency of capturing true APEX-tagged proteins. To mitigate this, it is recommended to determine the minimal bead amount through titration and apply stringent washing conditions to eliminate non-biotinylated proteins [15]. A recent report suggests that using 80–100 μ L of the bead volume is sufficient to enrich up to 2 mg of protein input [161].

Moreover, even using stringent washes with low amounts of urea and detergents, followed by an elution with the Laemmli buffer at high temperatures to recover biotinylated proteins, does not seem sufficient to remove efficiently non-biotinylated interactors [15,70,86,102,112], resulting in a significant background of non-biotinylated proteins often remaining in the proteomic data. Consequently, many studies rely on quantitative proteomic approaches to determine the sub-compartment proteomes [70,108,162,163] or APEX-tagged protein [89,112,148,164], often based on a ratiometric analysis without considering biotinylation sites.

Beyond APEX, other proximity labeling methods based on the biotin ligase from *E. coli* have been developed, including BioID (and its enhanced version BioID2) [163,165,166], DiQ-BioID (dimerization-induced quantitative BioID) [167], TurboID [89,163,168], AirID (ancestral BirA for proximity-dependent biotin identification) [169], and split-AirID [170]. While these methods also provide biotinylation, they often suffer from slow enzymatic kinetics, requiring long incubation periods with biotin (6–24 h for BioID and \sim 10 min for TurboID) [165,166,168]. In contrast, APEX enables efficient protein labeling within one minute of the hydrogen peroxide exposure, minimizing the background associated with an extended incubation and allowing for the precise capture of highly dynamic protein interactions [14]. This rapid reaction makes APEX the optimal choice for capturing rapid or transient interactions with an unparalleled temporal resolution.

The ratiometric analysis, while useful for determining protein localization within specific compartments or complexes, is limited in providing topological information about transmembrane proteins [86,163]. Common approaches to enrich biotinylated proteins, such as trypsin digestion followed by streptavidin-coated bead enrichment [86,160,171] or on-bead digestion [86,108,162], have proven to be inefficient in some cases.

To address these limitations, researchers have developed alternative strategies to enhance the recovery of biotinylated proteins identified by mass spectrometry. One ap-

proach involves the use of anti-biotin antibodies to enrich biotinylated peptides after tryptic digestion [117,160]. While this method is more efficient than traditional avidin–biotin interactions, it is technically demanding and often yields low recovery rates [163]. Other challenges include improving the accuracy of protein localization, particularly for proteins with dual cellular locations (e.g., inner vs. outer mitochondrial membrane) [15,86,118] and addressing issues related to the probe permeability and accessibility of residues in macromolecular complexes [15,172].

Biotin-tyramide, the main probe used for APEX assays, has a limited membrane permeability [15,89,90,96,172]. To overcome this, alternative probes such as desthiobiotin-phenol (DBP) have been developed, offering an improved membrane permeability [86,163]. Additionally, the development of the Spot-ID method based on the use of DBP, which focuses on the comprehensive identification of labeled sites, has shown promise in increasing the accuracy of the biotinylated site identification and reducing false positives [86,163]. Regarding the elution of biotinylated peptides obtained through Spot-ID, organic MS-friendly solvents, such as high-concentration formamide, appear to enhance the recovery efficiency [86,163]. Similarly, alkyne–phenol has been shown to be an equally effective and specific substrate for APEX, yielding a higher number of biotinylated site hits identified by MS [89,90,172]. Although comparable in efficiency to the Spot-ID method, alkyne–phenol is significantly more expensive.

Beyond probe optimization, recent advances in enzyme engineering have opened new avenues for enhancing the catalytic performance and stability of peroxidases used in proximity labeling. Gutierrez-Rus and colleagues [173] demonstrated that the integration of a Nuclear Magnetic Resonance-based hotspot identification with computational protein design platforms, such as FuncLib, can predict mutations that enhance the enzymatic function and thermal stability, by analyzing chemical shift perturbations upon substrate- or transition-state analog binding. Subsequently, FuncLib-guided mutagenesis enables the optimization of both the catalytic efficiency and structural robustness while minimizing deleterious trade-offs. Molecular dynamics simulations further assist by revealing non-productive substrate conformations that can be eliminated through rational engineering. This integrated strategy has already proven to be successful in improving the catalytic performance of Kemp eliminase, achieving enzymes with triple the activity and enhanced stability. Applying such an approach to APEX variants could refine substrate interactions and optimize kinetic parameters, expanding their utility in diverse biological contexts.

Choosing the best approach for enriching biotinylated proteins/peptides depends on the biological model, financial resources, and laboratory infrastructure. While APEX technology excels in capturing short-lived events and offers a variety of membrane-permeable probes, each experimental model presents unique challenges. Therefore, a careful experimental design is essential to avoid setbacks and ensure reliable results. APEX continues to be a powerful tool for high-resolution cellular and molecular research, driving innovation in the study of protein–protein interactions and cellular dynamics.

9. Conclusions

The APEX system has emerged as a powerful tool for elucidating protein interaction networks within native cellular contexts. A key advantage of this technique is its ability to label proteins in living cells while preserving molecular complexes and maintaining cellular compartment integrity. Thus, APEX technology enables us to study the subcellular localization of proteoforms and their different partners that they interact with in more detail and consequently deduce different functions among the proteoforms.

APEX has become an essential method for studying protein–ligand interactions under physiological conditions, preserving spatial associations while providing a high-resolution

mapping of interaction networks. This unparalleled precision not only enhances our understanding of molecular mechanisms and their cellular roles but also addresses key limitations of traditional protein–protein interaction analyses. By facilitating spatiotemporal investigations with exceptional accuracy, APEX is revolutionizing proteomics and molecular biology, unlocking new opportunities to explore dynamic biological systems and complex mechanistic questions.

Author Contributions: Conceptualization, J.M.Q.-F.; methodology, P.M.V.G. and T.A.S.C.; writing—original draft preparation, J.M.Q.-F.; writing—review and editing, J.M.Q.-F., S.C. and L.S.d.O.; visualization, J.M.Q.-F.; supervision, S.C., C.M. and P.G.; funding acquisition, S.C. and I.M.D.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants and fellowships awarded by the CAPES/PROEX program, CAPES/COFECUB program [88881.711954/2022-01], CNPq [316892/2023-8], and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal [FAPDF-00193-00000779/2021-40].

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The author J.M.Q.F acknowledges the Doctoral Scholarship in Molecular Pathology supported by the Brazil Scholarships Program—PAEC OEA/GCUB (Call No. 001/2019), under the Cooperation Agreement between the Organization of American States and the Coimbra Group of Brazilian Universities. The figures were created or modified using tools and resources from bioart.niaid.nih.gov, bioicons.com, molview.org, Protein Imager [174], and scidraw.io, all accessed in February 2025.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Sundberg, E.J. Structural Basis of Antibody-Antigen Interactions. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *524*, 23–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Syriopoulou, A.; Markopoulos, I.; Tzakos, A.G.; Mavromoustakos, T. Ligand-Receptor Interactions and Drug Design. *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2266*, 89–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hatty, C.R.; Le Brun, A.P.; Lake, V.; Clifton, L.A.; Liu, G.J.; James, M.; Banati, R.B. Investigating the Interactions of the 18kDa Translocator Protein and Its Ligand PK11195 in Planar Lipid Bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 1019–1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rivas-Pardo, J.A.; Alegre-Cebollada, J.; Ramírez-Sarmiento, C.A.; Fernandez, J.M.; Guixé, V. Identifying Sequential Substrate Binding at the Single-Molecule Level by Enzyme Mechanical Stabilization. *ACS Nano* **2015**, *9*, 3996–4005. [[CrossRef](#)]
5. Wagner, B.; Tharmann, R.; Haase, I.; Fischer, M.; Bausch, A.R. Cytoskeletal Polymer Networks: The Molecular Structure of Cross-Linkers Determines Macroscopic Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13974–13978. [[CrossRef](#)]
6. Swain, B.C.; Rout, J.; Tripathy, U. Interaction of Vitamin B12 with β -Lactoglobulin: A Computational Study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2022**, *40*, 2146–2155. [[CrossRef](#)]
7. Egea, P.F.; Klaholz, B.P.; Moras, D. Ligand-Protein Interactions in Nuclear Receptors of Hormones. *FEBS Lett.* **2000**, *476*, 62–67. [[CrossRef](#)]
8. Feng, Y.; Yan, Y.; He, J.; Tao, H.; Wu, Q.; Huang, S.Y. Docking and Scoring for Nucleic Acid–Ligand Interactions: Principles and Current Status. *Drug Discov. Today* **2022**, *27*, 838–847. [[CrossRef](#)]
9. Lee, Y.C. Biochemistry of Carbohydrate-protein Interaction 1. *FASEB J.* **1992**, *6*, 3193–3200. [[CrossRef](#)]
10. Xu, L.Z.; Sánchez, R.; Sali, A.; Heintz, N. Ligand Specificity of Brain Lipid-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 24711–24719. [[CrossRef](#)]
11. Young, P.R. Protein Hormones and Their Receptors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1992**, *3*, 408–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Martell, J.D.; Deerinck, T.J.; Sancak, Y.; Poulos, T.L.; Mootha, V.K.; Sosinsky, G.E.; Ellisman, M.H.; Ting, A.Y. Engineered Ascorbate Peroxidase as a Genetically Encoded Reporter for Electron Microscopy. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 1143–1148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Caverzan, A.; Passaia, G.; Rosa, S.B.; Ribeiro, C.W.; Lazzarotto, F.; Margis-Pinheiro, M. Plant Responses to Stresses: Role of Ascorbate Peroxidase in the Antioxidant Protection. *Genet. Mol. Biol.* **2012**, *35*, 1011–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Lam, S.S.; Martell, J.D.; Kamer, K.J.; Deerinck, T.J.; Ellisman, M.H.; Mootha, V.K.; Ting, A.Y. Directed Evolution of APEX2 for Electron Microscopy and Proximity Labeling. *Nat. Methods* **2014**, *12*, 51–54. [[CrossRef](#)]
15. Hung, V.; Udeshi, N.D.; Lam, S.S.; Loh, K.H.; Cox, K.J.; Pedram, K.; Carr, S.A.; Ting, A.Y. Spatially Resolved Proteomic Mapping in Living Cells with the Engineered Peroxidase APEX2. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 456–475. [[CrossRef](#)]
16. Mittler, R. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. *Trends Plant Sci.* **2002**, *7*, 405–410. [[CrossRef](#)]
17. Koua, D.; Cerutti, L.; Falquet, L.; Sigrist, C.J.A.; Theiler, G.; Hulo, N.; Dunand, C. PeroxiBase: A Database with New Tools for Peroxidase Family Classification. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D261–D266. [[CrossRef](#)]
18. Patterson, W.R.; Poulos, T.L. Crystal Structure of Recombinant Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *Biochemistry* **1995**, *34*, 4331–4341. [[CrossRef](#)]
19. Lad, L.; Mewies, M.; Raven, E.L. Substrate Binding and Catalytic Mechanism in Ascorbate Peroxidase: Evidence for Two Ascorbate Binding Sites. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13774–13781. [[CrossRef](#)]
20. Zémocký, M. Phylogenetic Relationships in Class I of the Superfamily of Bacterial, Fungal, and Plant Peroxidases. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 3297–3309. [[CrossRef](#)]
21. Morgenstern, I.; Klopman, S.; Hibbett, D.S. Molecular Evolution and Diversity of Lignin Degrading Heme Peroxidases in the Agaricomycetes. *J. Mol. Evol.* **2008**, *66*, 243–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mathé, C.; Barre, A.; Jourda, C.; Dunand, C. Evolution and Expression of Class III Peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *500*, 58–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Welinder, K.G. Covalent Structure of the Glycoprotein Horseradish Peroxidase (EC 1.11.1.7). *FEBS Lett.* **1976**, *72*, 19–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Welinder, K.G. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. Amino and Carboxyl Termini, Cyanogen Bromide and Tryptic Fragments, the Complete Sequence, and Some Structural Characteristics of Horseradish Peroxidase C. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *96*, 483–502. [[CrossRef](#)]
25. Mayer, G.; Bendayan, M. Biotinyl-Tyramide: A Novel Approach for Electron Microscopic Immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **1997**, *45*, 1449–1454. [[CrossRef](#)]
26. Litovchick, L. Detection of an Antigen on an Immunoblot. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2019**, *2019*, 616–621. [[CrossRef](#)]
27. Bobrow, M.N.; Litt, G.J.; Shaughnessy, K.J.; Mayer, P.C.; Conlon, J. The Use of Catalyzed Reporter Deposition as a Means of Signal Amplification in a Variety of Formats. *J. Immunol. Methods* **1992**, *150*, 145–149. [[CrossRef](#)]
28. Veitch, N.C. Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 249–259. [[CrossRef](#)]
29. Badejo, A.A.; Wada, K.; Gao, Y.; Maruta, T.; Sawa, Y.; Shigeoka, S.; Ishikawa, T. Translocation and the Alternative D-Galacturonate Pathway Contribute to Increasing the Ascorbate Level in Ripening Tomato Fruits Together with the D-Mannose/L-Galactose Pathway. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 229–239. [[CrossRef](#)]
30. Maruta, T.; Sawa, Y.; Shigeoka, S.; Ishikawa, T. Diversity and Evolution of Ascorbate Peroxidase Functions in Chloroplasts: More than Just a Classical Antioxidant Enzyme? *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, 1377–1386. [[CrossRef](#)]
31. Zámocký, M.; Furtmüller, P.G.; Obinger, C. Evolution of Structure and Function of Class I Peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *500*, 45–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Taqui Khan, M.M.; Martell, A.E. Metal Ion and Metal Chelate Catalyzed Oxidation of Ascorbic Acid by Molecular Oxygen. I. Cupric and Ferric Ion Catalyzed Oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4176–4185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bodannes, R.S.; Chan, P.C. Ascorbic Acid as a Scavenger of Singlet Oxygen. *FEBS Lett.* **1979**, *105*, 195–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Teixeira, F.K.; Menezes-Benavente, L.; Margis, R.; Margis-Pinheiro, M. Analysis of the Molecular Evolutionary History of the Ascorbate Peroxidase Gene Family: Inferences from the Rice Genome. *J. Mol. Evol.* **2004**, *59*, 761–770. [[CrossRef](#)]
35. Chen, G.X.; Asada, K. Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic and Molecular Properties. *Plant Cell Physiol.* **1989**, *30*, 987–998. [[CrossRef](#)]
36. Miyake, C.; Asada, K. Thylakoid-Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts and Photoreduction of Its Primary Oxidation Product Monodehydroascorbate Radicals in Thylakoids. *Plant Cell Physiol.* **1992**, *33*, 541–553. [[CrossRef](#)]
37. Yamaguchi, K.; Mori, H.; Nishimura, M. A Novel Isoenzyme of Ascorbate Peroxidase Localized on Glyoxysomal and Leaf Peroxisomal Membranes in Pumpkin. *Plant Cell Physiol.* **1995**, *36*, 1157–1162. [[CrossRef](#)]
38. Kagawa, T.; Beevers, H. The Development of Microbodies (Glyoxysomes and Leaf Peroxisomes) in Cotyledons of Germinating Watermelon Seedlings. *Plant Physiol.* **1975**, *55*, 258–264. [[CrossRef](#)]
39. Bunkelmann, J.R.; Trelease, R.N. Ascorbate Peroxidase: A Prominent Membrane Protein in Oilseed Glyoxysomes. *Plant Physiol.* **1996**, *110*, 589–598. [[CrossRef](#)]
40. Han, S.H.; Park, Y.J.; Park, C.M. Light Primes the Thermally Induced Detoxification of Reactive Oxygen Species during Development of Thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **2019**, *60*, 230–241. [[CrossRef](#)]
41. Chew, O.; Whelan, J.; Millar, A.H. Molecular Definition of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Arabidopsis Mitochondria Reveals Dual Targeting of Antioxidant Defenses in Plants. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46869–46877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Hong, S.H.; Tripathi, B.N.; Chung, M.S.; Cho, C.; Lee, S.; Kim, J.H.; Bai, H.W.; Bae, H.J.; Cho, J.Y.; Chung, B.Y.; et al. Functional Switching of Ascorbate Peroxidase 2 of Rice (OsAPX2) between Peroxidase and Molecular Chaperone. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kaur, S.; Prakash, P.; Bak, D.-H.; Hong, S.H.; Cho, C.; Chung, M.-S.; Kim, J.-H.; Lee, S.; Bai, H.-W.; Lee, S.Y.; et al. Regulation of Dual Activity of Ascorbate Peroxidase 1 From Arabidopsis Thaliana by Conformational Changes and Posttranslational Modifications. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 678111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Chen, C.L.; Hu, Y.; Udeshi, N.D.; Lau, T.Y.; Wirtz-Peitz, F.; He, L.; Ting, A.Y.; Carr, S.A.; Perrimon, N. Proteomic Mapping in Live Drosophila Tissues Using an Engineered Ascorbate Peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 12093–12098. [[CrossRef](#)]
45. Hwang, J.; Espenshade, P.J. Proximity-Dependent Biotin Labelling in Yeast Using the Engineered Ascorbate Peroxidase APEX2. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 2463–2469. [[CrossRef](#)]
46. Welinder, K.G. Superfamily of Plant, Fungal and Bacterial Peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 388–393. [[CrossRef](#)]
47. Patterson, W.R.; Poulos, T.L. Characterization and Crystallization of Recombinant Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17020–17024. [[CrossRef](#)]
48. Sharp, K.H.; Moody, P.C.E.; Brown, K.A.; Raven, E.L. Crystal Structure of the Ascorbate Peroxidase-Salicylhydroxamic Acid Complex. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8644–8651. [[CrossRef](#)]
49. Sharp, K.H.; Mewies, M.; Moody, P.C.E.; Raven, E.L. Crystal Structure of the Ascorbate Peroxidase-Ascorbate Complex. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 303–307. [[CrossRef](#)]
50. Macdonald, I.K.; Badyal, S.K.; Ghamsari, L.; Moody, P.C.E.; Raven, E.L. Interaction of Ascorbate Peroxidase with Substrates: A Mechanistic and Structural Analysis. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7808–7817. [[CrossRef](#)]
51. Kwon, H.; Basran, J.; Casadei, C.M.; Fielding, A.J.; Schrader, T.E.; Ostermann, A.; Devos, J.M.; Aller, P.; Blakeley, M.P.; Moody, P.C.E.; et al. Direct Visualization of a Fe(IV)-OH Intermediate in a Heme Enzyme. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Efimov, I.; Papadopoulou, N.D.; McLean, K.J.; Badyal, S.K.; Macdonald, I.K.; Munro, A.W.; Moody, P.C.E.; Raven, E.L. The Redox Properties of Ascorbate Peroxidase. *Biochemistry* **2007**, *46*, 8017–8023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Poulos, T.L. Heme Enzyme Structure and Function. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3919–3962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Moody, P.C.E.; Raven, E.L. The Nature and Reactivity of Ferryl Heme in Compounds I and II. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 427–435. [[CrossRef](#)]
55. Cvjetan, N.; Walde, P. Ferric Heme b in Aqueous Micellar and Vesicular Systems: State-of-the-Art and Challenges. *Q. Rev. Biophys.* **2023**, *56*, e1. [[CrossRef](#)]
56. Ansari, M.; Bhattacharjee, S.; Pantazis, D.A. Correlating Structure with Spectroscopy in Ascorbate Peroxidase Compound II. *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 9640–9656. [[CrossRef](#)]
57. Efimov, I.; Badyal, S.K.; Metcalfe, C.L.; MacDonald, I.; Gumiero, A.; Raven, E.L.; Moody, P.C.E. Proton Delivery to Ferryl Heme in a Heme Peroxidase: Enzymatic Use of the Grothuss Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15376–15383. [[CrossRef](#)]
58. Kwon, H.; Basran, J.; Pathak, C.; Hussain, M.; Freeman, S.L.; Fielding, A.J.; Bailey, A.J.; Stefanou, N.; Sparkes, H.A.; Tosha, T.; et al. XFEL Crystal Structures of Peroxidase Compound II. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2021**, *60*, 14578–14585. [[CrossRef](#)]
59. Chin, D.C.; Senthil Kumar, R.; Suen, C.S.; Chien, C.Y.; Hwang, M.J.; Hsu, C.H.; Xuhan, X.; Lai, Z.X.; Yeh, K.W. Plant Cytosolic Ascorbate Peroxidase with Dual Catalytic Activity Modulates Abiotic Stress Tolerances. *iScience* **2019**, *16*, 31–49. [[CrossRef](#)]
60. Mittler, R.; Zilinskas, B.A. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of a cDNA Encoding Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *FEBS Lett.* **1991**, *289*, 257–259. [[CrossRef](#)]
61. Caldwell, C.R.; Turano, F.J.; McMahon, M.B. Identification of Two Cytosolic Ascorbate Peroxidase cDNAs from Soybean Leaves and Characterization of Their Products by Functional Expression in E. Coli. *Planta* **1997**, *204*, 120–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Dalton, D.A.; Diaz Del Castillo, L.; Kahn, M.L.; Joyner, S.L.; Chatfield, J.M. Heterologous Expression and Characterization of Soybean Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *328*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Marquez, L.A.; Quitoriano, M.; Zilinskas, B.A.; Dunford, H.B. Kinetic and Spectral Properties of Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *FEBS Lett.* **1996**, *389*, 153–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Wada, N.; Kinoshita, S.; Matsuo, M.; Amako, K.; Miyake, C.; Asada, K. Purification and Molecular Properties of Ascorbate Peroxidase from Bovine Eye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *242*, 256–261. [[CrossRef](#)]
65. Zhang, Q.; Lee, W.C.A.; Paul, D.L.; Ginty, D.D. Multiplexed Peroxidase-Based Electron Microscopy Labeling Enables Simultaneous Visualization of Multiple Cell Types. *Nat. Neurosci.* **2019**, *22*, 828–839. [[CrossRef](#)]
66. Ke, M.; Yuan, X.; He, A.; Yu, P.; Chen, W.; Shi, Y.; Hunter, T.; Zou, P.; Tian, R. Spatiotemporal Profiling of Cytosolic Signaling Complexes in Living Cells by Selective Proximity Proteomics. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 71. [[CrossRef](#)]
67. Seligman, A.M.; Karnovsky, M.J.; Wasserkrug, H.L.; Hanker, J.S. Nondroplet Ultrastructural Demonstration of Cytochrome Oxidase Activity with a Polymerizing Osmiophilic Reagent, Diaminobenzidine (DAB). *J. Cell Biol.* **1968**, *38*, 1–14. [[CrossRef](#)]
68. Grabenbauer, M. Correlative Light and Electron Microscopy of GFP. *Methods Cell Biol.* **2012**, *111*, 117–138. [[CrossRef](#)]

69. Hanker, J.S.; Romanovicz, D.K.; Padykula, H.A. Tissue Fixation and Osmium Black Formation with Nonvolatile Octavalent Osmium Compounds. *Histochemistry* **1976**, *49*, 263–291. [[CrossRef](#)]
70. Rhee, H.W.; Zou, P.; Udeshi, N.D.; Martell, J.D.; Mootha, V.K.; Carr, S.A.; Ting, A.Y. Proteomic Mapping of Mitochondria in Living Cells via Spatially Restricted Enzymatic Tagging. *Science* **2013**, *339*, 1328–1331. [[CrossRef](#)]
71. Martell, J.D.; Deerinck, T.J.; Lam, S.S.; Ellisman, M.H.; Ting, A.Y. Electron Microscopy Using the Genetically Encoded APEX2 Tag in Cultured Mammalian Cells. *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 1792–1816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Lee, B.R.; Lee, T.J.; Oh, S.; Li, C.; Song, J.H.A.; Marshall, B.; Zhi, W.; Kwon, S.H. Ascorbate Peroxidase-mediated in Situ Labelling of Proteins in Secreted Exosomes. *J. Extracell. Vesicles* **2022**, *11*, e12239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Rae, J.; Ferguson, C.; Ariotti, N.; Webb, R.I.; Cheng, H.H.; Mead, J.L.; Riches, J.D.; Hunter, D.J.B.; Martel, N.; Baltos, J.; et al. A Robust Method for Particulate Detection of a Genetic Tag for 3D Electron Microscopy. *Elife* **2021**, *10*, e64630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Green, A.P.; Hayashi, T.; Mittl, P.R.E.; Hilvert, D. A Chemically Programmed Proximal Ligand Enhances the Catalytic Properties of a Heme Enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 11344–11352. [[CrossRef](#)]
75. Becker, J.T.; Auerbach, A.A.; Harris, R.S. APEX3—An Optimized Tool for Rapid and Unbiased Proximity Labeling. *J. Mol. Biol.* **2023**, *435*, 168145. [[CrossRef](#)]
76. Han, Y.; Branon, T.C.; Martell, J.D.; Boassa, D.; Shechner, D.; Ellisman, M.H.; Ting, A. Directed Evolution of Split APEX2 Peroxidase. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 619–635. [[CrossRef](#)]
77. Xue, M.; Hou, J.; Wang, L.; Cheng, D.; Lu, J.; Zheng, L.; Xu, T. Optimizing the Fragment Complementation of APEX2 for Detection of Specific Protein-Protein Interactions in Live Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12039. [[CrossRef](#)]
78. Huang, M.; Sen, Lin, W.C.; Chang, J.H.; Cheng, C.H.; Wang, H.Y.; Mou, K.Y. The Cysteine-Free Single Mutant C32S of APEX2 Is a Highly Expressed and Active Fusion Tag for Proximity Labeling Applications. *Protein Sci.* **2019**, *28*, 1703–1712. [[CrossRef](#)]
79. Raven, E.L. Understanding Functional Diversity and Substrate Specificity in Haem Peroxidases: What Can We Learn from Ascorbate Peroxidase? *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 367–381. [[CrossRef](#)]
80. Sharp, K.H.; Moody, P.C.E.; Raven, E.L. A New Framework for Understanding Substrate Binding and Functional Diversity in Haem Peroxidases. *Dalton Trans.* **2003**, *3*, 4208–4215. [[CrossRef](#)]
81. Çelik, A.; Cullis, P.M.; Lloyd Raven, E. Catalytic Oxidation of P-Cresol by Ascorbate Peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *373*, 175–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Onele, A.O.; Chasov, A.V.; Trifonova, T.V.; Minibayeva, F.V. Ascorbate Peroxidase of Moss *Dicranum Scoparium*: Gene Identification and Enzyme Activity. *Dokl. Biochem. Biophys.* **2019**, *489*, 380–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Leskinen, H.L.; Udvadia, A.J. Development and Validation of a Proximity Labeling Fusion Protein Construct to Identify the Protein-Protein Interactions of Transcription Factors. *Methods Mol. Biol.* **2025**, *2848*, 269–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Debski, D.; Smulik, R.; Zielonka, J.; Michałowski, B.; Jakubowska, M.; Debowska, K.; Adamus, J.; Marcinek, A.; Kalyanaraman, B.; Sikora, A. Mechanism of Oxidative Conversion of Amplex[®] Red to Resorufin: Pulse Radiolysis and Enzymatic Studies. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *95*, 323–332. [[CrossRef](#)]
85. Vilen, Z.; Reeves, A.E.; O’Leary, T.R.; Joeh, E.; Kamasawa, N.; Huang, M.L. Cell Surface Engineering Enables Surfaceome Profiling. *ACS Chem. Biol.* **2023**, *18*, 701–710. [[CrossRef](#)]
86. Lee, S.Y.; Kang, M.G.; Shin, S.; Kwak, C.; Kwon, T.; Seo, J.K.; Kim, J.S.; Rhee, H.W. Architecture Mapping of the Inner Mitochondrial Membrane Proteome by Chemical Tools in Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3651–3662. [[CrossRef](#)]
87. An, J.; Kim, S.; Shrinidhi, A.; Kim, J.; Banna, H.; Sung, G.; Park, K.M.; Kim, K. Purification of Protein Therapeutics via High-Affinity Supramolecular Host–Guest Interactions. *Nat. Biomed. Eng.* **2020**, *4*, 1044–1052. [[CrossRef](#)]
88. Zhou, Y.; Wang, G.; Wang, P.; Li, Z.; Yue, T.; Wang, J.; Zou, P. Expanding APEX2 Substrates for Proximity-Dependent Labeling of Nucleic Acids and Proteins in Living Cells. *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* **2019**, *58*, 11763–11767. [[CrossRef](#)]
89. Qin, W.; Cheah, J.S.; Xu, C.; Messing, J.; Freibaum, B.D.; Boeynaems, S.; Taylor, J.P.; Udeshi, N.D.; Carr, S.A.; Ting, A.Y. Dynamic Mapping of Proteome Trafficking within and between Living Cells by TransitID. *Cell* **2023**, *186*, 3307–3324.e30. [[CrossRef](#)]
90. Li, Y.; Tian, C.; Liu, K.; Zhou, Y.; Yang, J.; Zou, P. A Clickable APEX Probe for Proximity-Dependent Proteomic Profiling in Yeast. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27*, 858–865.e8. [[CrossRef](#)]
91. Oakley, J.V.; Buksh, B.F.; Fernández, D.F.; Oblinsky, D.G.; Seath, C.P.; Geri, J.B.; Scholes, G.D.; MacMillan, D.W.C. Radius Measurement via Super-Resolution Microscopy Enables the Development of a Variable Radii Proximity Labeling Platform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2203027119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Samavarchi-Tehrani, P.; Samson, R.; Gingras, A.C. Proximity Dependent Biotinylation: Key Enzymes and Adaptation to Proteomics Approaches. *Mol. Cell. Proteomics* **2020**, *19*, 757–773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Lee, P.J.; Sun, Y.; Soares, A.R.; Fai, C.; Picciotto, M.R.; Guo, J.U. Alternative Translation Initiation Produces Synaptic Organizer Proteoforms with Distinct Localization and Functions. *Mol. Cell* **2024**, *84*, 3967–3978.e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Clinton, L.K.; Blurton-Jones, M.; Myczek, K.; Trojanowski, J.Q.; LaFerla, F.M. Synergistic Interactions between Abeta, Tau, and Alpha-Synuclein: Acceleration of Neuropathology and Cognitive Decline. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 7281–7289. [[CrossRef](#)]

95. Seidi, A.; Muellner-Wong, L.S.; Rajendran, E.; Tjhin, E.T.; Dagley, L.F.; Aw, V.Y.T.; Faou, P.; Webb, A.I.; Tonkin, C.J.; van Dooren, G.G. Elucidating the Mitochondrial Proteome of *Toxoplasma Gondii* Reveals the Presence of a Divergent Cytochrome c Oxidase. *eLife* **2018**, *7*, e38131. [[CrossRef](#)]
96. Singer-Krüger, B.; Fröhlich, T.; Franz-Wachtel, M.; Nalpas, N.; Macek, B.; Jansen, R.P. APEX2-Mediated Proximity Labeling Resolves Protein Networks in *Saccharomyces Cerevisiae* Cells. *FEBS J.* **2020**, *287*, 325–344. [[CrossRef](#)]
97. Vélez-Ramírez, D.E.; Shimogawa, M.M.; Ray, S.S.; Lopez, A.; Rayatpisheh, S.; Langousis, G.; Gallagher-Jones, M.; Dean, S.; Wohlschlegel, J.A.; Hill, K.L. APEX2 Proximity Proteomics Resolves Flagellum Subdomains and Identifies Flagellum Tip-Specific Proteins in *Trypanosoma Brucei*. *mSphere* **2021**, *6*, e01090-20. [[CrossRef](#)]
98. Mavylutov, T.; Chen, X.; Guo, L.; Yang, J. APEX2- Tagging of Sigma 1-Receptor Indicates Subcellular Protein Topology with Cytosolic N-Terminus and ER Luminal C-Terminus. *Protein Cell* **2018**, *9*, 733–737. [[CrossRef](#)]
99. Müller, M.; James, C.; Lenz, C.; Urlaub, H.; Kehlenbach, R.H. Probing the Environment of Emerin by Enhanced Ascorbate Peroxidase 2 (APEX2)-Mediated Proximity Labeling. *Cells* **2020**, *9*, 605. [[CrossRef](#)]
100. Tran, J.R.; Paulson, D.I.; Moresco, J.J.; Adam, S.A.; Yates, J.R.; Goldman, R.D.; Zheng, Y. An Apex2 Proximity Ligation Method for Mapping Interactions with the Nuclear Lamina. *J. Cell Biol.* **2021**, *220*, e202002129. [[CrossRef](#)]
101. Xiao, Z.; Huang, C.; Ge, H.; Wang, Y.; Duan, X.; Wang, G.; Zheng, L.; Dong, J.; Huang, X.; Zhang, Y.; et al. Proximity Labeling Facilitates Defining the Proteome Neighborhood of Photosystem II Oxygen Evolution Complex in a Model Cyanobacterium. *Mol. Cell. Proteomics* **2022**, *21*, 100440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Charneau, S.; de Oliveira, L.S.; Zenonos, Z.; Hopp, C.S.; Bastos, I.M.D.; Loew, D.; Lombard, B.; Pandolfo Silveira, A.; de Carvalho Nardeli Basilio Lobo, G.; Bao, S.N.; et al. APEX2-Based Proximity Proteomic Analysis Identifies Candidate Interactors for *Plasmodium Falciparum* Knob-Associated Histidine-Rich Protein in Infected Erythrocytes. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 11242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Hung, V.; Zou, P.; Rhee, H.W.; Udeshi, N.D.; Cracan, V.; Svinkina, T.; Carr, S.A.; Mootha, V.K.; Ting, A.Y. Proteomic Mapping of the Human Mitochondrial Intermembrane Space in Live Cells via Ratiometric APEX Tagging. *Mol. Cell* **2014**, *55*, 332–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Hung, V.; Lam, S.S.; Udeshi, N.D.; Svinkina, T.; Guzman, G.; Mootha, V.K.; Carr, S.A.; Ting, A.Y. Proteomic Mapping of Cytosol-Facing Outer Mitochondrial and ER Membranes in Living Human Cells by Proximity Biotinylation. *eLife* **2017**, *6*, e24463. [[CrossRef](#)]
105. Mick, D.U.; Rodrigues, R.B.; Leib, R.D.; Adams, C.M.; Chien, A.S.; Gygi, S.P.; Nachury, M.V. Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling. *Dev. Cell* **2015**, *35*, 497–512. [[CrossRef](#)]
106. Cho, I.T.; Adelmant, G.; Lim, Y.; Marto, J.A.; Cho, G.; Golden, J.A. Ascorbate Peroxidase Proximity Labeling Coupled with Biochemical Fractionation Identifies Promoters of Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contacts. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 16382–16392. [[CrossRef](#)]
107. Markmiller, S.; Soltanieh, S.; Server, K.L.; Mak, R.; Jin, W.; Fang, M.Y.; Luo, E.C.; Krach, F.; Yang, D.; Sen, A.; et al. Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules. *Cell* **2018**, *172*, 590–604.e13. [[CrossRef](#)]
108. Lobingier, B.T.; Hüttenhain, R.; Eichel, K.; Miller, K.B.; Ting, A.Y.; von Zastrow, M.; Krogan, N.J. An Approach to Spatiotemporally Resolve Protein Interaction Networks in Living Cells. *Cell* **2017**, *169*, 350–360.e12. [[CrossRef](#)]
109. Paek, J.; Kalocsay, M.; Staus, D.P.; Wingler, L.; Pascolutti, R.; Paulo, J.A.; Gygi, S.P.; Kruse, A.C. Multidimensional Tracking of GPCR Signaling via Peroxidase-Catalyzed Proximity Labeling. *Cell* **2017**, *169*, 338–349.e11. [[CrossRef](#)]
110. Reeves, A.E.; Huang, M.L. Proximity Labeling Technologies to Illuminate Glycan–Protein Interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2023**, *72*, 102233. [[CrossRef](#)]
111. Vilen, Z.; Joeh, E.; Critcher, M.; Parker, C.G.; Huang, M.L. Proximity Tagging Identifies the Glycan-Mediated Glycoprotein Interactors of Galectin-1 in Muscle Stem Cells. *ACS Chem. Biol.* **2021**, *16*, 1994–2003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Jing, J.; He, L.; Sun, A.; Quintana, A.; Ding, Y.; Ma, G.; Tan, P.; Liang, X.; Zheng, X.; Chen, L.; et al. Proteomic Mapping of ER-PM Junctions Identifies STIMATE as a Regulator of Ca²⁺ Influx. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1339–1347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Han, S.; Udeshi, N.D.; Deerinck, T.J.; Svinkina, T.; Ellisman, M.H.; Carr, S.A.; Ting, A.Y. Proximity Biotinylation as a Method for Mapping Proteins Associated with MtDNA in Living Cells. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 404–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Ting, A.Y.; Stawski, P.S.; Draycott, A.S.; Udeshi, N.D.; Lehrman, E.K.; Wilton, D.K.; Svinkina, T.; Deerinck, T.J.; Ellisman, M.H.; Stevens, B.; et al. Proteomic Analysis of Unbounded Cellular Compartments: Synaptic Clefts. *Cell* **2016**, *166*, 1295–1307.e21. [[CrossRef](#)]
115. Trifault, B.; Mamontova, V.; Burger, K. In Vivo Proximity Labeling of Nuclear and Nucleolar Proteins by a Stably Expressed, DNA Damage-Responsive NONO-APEX2 Fusion Protein. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 914873. [[CrossRef](#)]
116. Li, X.; Zhou, J.; Zhao, W.; Wen, Q.; Wang, W.; Peng, H.; Gao, Y.; Bouchonville, K.J.; Offer, S.M.; Chan, K.; et al. Defining Proximity Proteome of Histone Modifications by Antibody-Mediated Protein A-APEX2 Labeling. *Genomics Proteomics Bioinforma.* **2022**, *20*, 87–100. [[CrossRef](#)]

117. Udeshi, N.D.; Pedram, K.; Svinkina, T.; Fereshetian, S.; Myers, S.A.; Aygun, O.; Krug, K.; Clauser, K.; Ryan, D.; Ast, T.; et al. Antibodies to Biotin Enable Large-Scale Detection of Biotinylation Sites on Proteins. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 1167–1170. [[CrossRef](#)]
118. Lee, S.Y.; Kang, M.G.; Park, J.S.; Lee, G.; Ting, A.Y.; Rhee, H.W. APEX Fingerprinting Reveals the Subcellular Localization of Proteins of Interest. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 1837–1847. [[CrossRef](#)]
119. Mihelc, E.M.; Angel, S.; Stahelin, R.V.; Mattoo, S. The CryoAPEX Method for Electron Microscopy Analysis of Membrane Protein Localization within Ultrastructurally-Preserved Cells. *J. Vis. Exp.* **2020**, *2020*, e60677. [[CrossRef](#)]
120. Sengupta, R.; Poderycki, M.J.; Mattoo, S. CryoAPEX—An Electron Tomography Tool for Subcellular Localization of Membrane Proteins. *J. Cell Sci.* **2019**, *132*, jcs222315. [[CrossRef](#)]
121. Wu, J.-W.; Wang, C.-W.; Hong, W.Y.; Jang, A.C.C.; Chang, Y.-C. Detecting Native Protein-Protein Interactions by APEX2 Proximity Labeling in Drosophila Tissues. *Bio-Protocol* **2024**, *14*, e5090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Reinke, A.W.; Mak, R.; Troemel, E.R.; Ben, E.J. In Vivo Mapping of Tissue- and Subcellular-Specific Proteomes in Caenorhabditis Elegans. *Sci. Adv.* **2017**, *3*, e1602426. [[CrossRef](#)]
123. Rosenberg, A.; Sibley, L.D. Toxoplasma Gondii Secreted Effectors Co-Opt Host Repressor Complexes to Inhibit Necroptosis. *Cell Host Microbe* **2021**, *29*, 1186–1198.e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Jaisinghani, N.; Previti, M.L.; Andrade, J.; Askenazi, M.; Ueberheide, B.; Seeliger, J.C. Proteomics from Compartment-Specific APEX2 Labeling in Mycobacterium Tuberculosis Reveals Type VII Secretion Substrates in the Cell Wall. *Cell Chem. Biol.* **2024**, *31*, 523–533.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Li, H.; He, C.-W.; Zhu, J.; Xie, Z. A Validated Set of Ascorbate Peroxidase-Based Organelle Markers for Electron Microscopy of Saccharomyces Cerevisiae. *mSphere* **2022**, *7*, e0010722. [[CrossRef](#)]
126. Shen, C.; Zuo, Z. Zebrafish (*Danio Rerio*) as an Excellent Vertebrate Model for the Development, Reproductive, Cardiovascular, and Neural and Ocular Development Toxicity Study of Hazardous Chemicals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 43599–43614. [[CrossRef](#)]
127. Malet, J.K.; Impens, F.; Carvalho, F.; Hamon, M.A.; Cossart, P.; Ribet, D. Rapid Remodeling of the Host Epithelial Cell Proteome by the Listeriolysin O (LLO) Pore-Forming Toxin. *Mol. Cell. Proteom.* **2018**, *17*, 1627–1636. [[CrossRef](#)]
128. Vorwerk, S.; Krieger, V.; Deiwick, J.; Hensel, M.; Hansmeier, N. Proteomes of Host Cell Membranes Modified by Intracellular Activities of Salmonella Enterica. *Mol. Cell. Proteom.* **2015**, *14*, 81–92. [[CrossRef](#)]
129. Renuse, S.; Madugundu, A.K.; Jung, J.H.; Byeon, S.K.; Goldschmidt, H.L.; Tahir, R.; Meyers, D.; Kim, D.I.; Cutler, J.; Kim, K.P.; et al. Signature Fragment Ions of Biotinylated Peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2020**, *31*, 394–404. [[CrossRef](#)]
130. Chen, W.N.U.; Yu, L.R.; Strittmatter, E.F.; Thrall, B.D.; Camp, D.G.; Smith, R.D. Detection of in Situ Labeled Cell Surface Proteins by Mass Spectrometry: Application to the Membrane Subproteome of Human Mammary Epithelial Cells. *Proteomics* **2003**, *3*, 1647–1651. [[CrossRef](#)]
131. Schopfer, L.M.; Champion, M.M.; Tamblyn, N.; Thompson, C.M.; Lockridge, O. Characteristic Mass Spectral Fragments of the Organophosphorus Agent FP-Biotin and FP-Biotinylated Peptides from Trypsin and Bovine Albumin (Tyr410). *Anal. Biochem.* **2005**, *345*, 122–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Santos, M.D.M.; Camillo-Andrade, A.C.; Rodriguez, A.; Durán, R. A Module for Analyzing Interactomes via APEX-MS Integrated into PatternLab for Proteomics. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2024**, *35*, 1055–1058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Clasen, M.A.; Santos, M.D.M.; Kurt, L.U.; Fischer, J.; Camillo-Andrade, A.C.; Sales, L.A.; de Arruda Campos Brasil de Souza, T.; Lima, D.B.; Gozzo, F.C.; Valente, R.H.; et al. PatternLab V Handles Multiplex Spectra in Shotgun Proteomic Searches and Increases Identification. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2023**, *34*, 794–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Kim, M.S.; Zhong, J.; Pandey, A. Common Errors in Mass Spectrometry-Based Analysis of Post-Translational Modifications. *Proteomics* **2016**, *16*, 700–714. [[CrossRef](#)]
135. Creasy, D.M.; Cottrell, J.S. Unimod: Protein Modifications for Mass Spectrometry. *Proteomics* **2004**, *4*, 1534–1536. [[CrossRef](#)]
136. Padrón, A.; Iwasaki, S.; Ingolia, N.T. Proximity RNA Labeling by APEX-Seq Reveals the Organization of Translation Initiation Complexes and Repressive RNA Granules. *Mol. Cell* **2019**, *75*, 875–887.e5. [[CrossRef](#)]
137. Fazal, F.M.; Han, S.; Parker, K.R.; Kaewsapsak, P.; Xu, J.; Boettiger, A.N.; Chang, H.Y.; Ting, A.Y. Atlas of Subcellular RNA Localization Revealed by APEX-Seq. *Cell* **2019**, *178*, 473–490.e26. [[CrossRef](#)]
138. Flynn, R.A.; Pedram, K.; Malaker, S.A.; Batista, P.J.; Smith, B.A.H.; Johnson, A.G.; George, B.M.; Majzoub, K.; Villalta, P.W.; Carette, J.E.; et al. Small RNAs Are Modified with N-Glycans and Displayed on the Surface of Living Cells. *Cell* **2021**, *184*, 3109–3124.e22. [[CrossRef](#)]
139. Gao, X.D.; Tu, L.C.; Mir, A.; Rodriguez, T.; Ding, Y.; Leszyk, J.; Dekker, J.; Shaffer, S.A.; Zhu, L.J.; Wolfe, S.A.; et al. C-BERST: Defining Subnuclear Proteomic Landscapes at Genomic Elements with DCas9-APEX2. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 433–436. [[CrossRef](#)]
140. Myers, S.A.; Wright, J.; Peckner, R.; Kalish, B.T.; Zhang, F.; Carr, S.A. Discovery of Proteins Associated with a Predefined Genomic Locus via DCas9-APEX-Mediated Proximity Labeling. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 437–439. [[CrossRef](#)]
141. Wang, X.; Qin, G.; Yang, J.; Zhao, C.; Ren, J.; Qu, X. A Subcellular Selective APEX2-Based Proximity Labeling Used for Identifying Mitochondrial G-Quadruplex DNA Binding Proteins. *Nucleic Acids Res.* **2025**, *53*, gkae1259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

142. Kaewsapsak, P.; Shechner, D.M.; Mallard, W.; Rinn, J.L.; Ting, A.Y. Live-Cell Mapping of Organelle-Associated RNAs via Proximity Biotinylation Combined with Protein-RNA Crosslinking. *eLife* **2017**, *6*, e29224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Benhalevy, D.; Anastasakis, D.G.; Hafner, M. Proximity-CLIP Provides a Snapshot of Protein-Occupied RNA Elements in Subcellular Compartments. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 1074–1082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Benhalevy, D.; Hafner, M. Proximity-CLIP Provides a Snapshot of Protein-Occupied RNA Elements at Subcellular Resolution and Transcriptome-Wide Scale. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2166*, 283–305. [[CrossRef](#)]
145. Han, S.; Zhao, B.S.; Myers, S.A.; Carr, S.A.; He, C.; Ting, A.Y. RNA-Protein Interaction Mapping via MS2- or Cas13-Based APEX Targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 22068–22079. [[CrossRef](#)]
146. Blank, H.M.; Griffith, W.P.; Polymenis, M. Targeting APEX2 to the MRNA Encoding Fatty Acid Synthase β in Yeast Identifies Interacting Proteins That Control Its Abundance in the Cell Cycle. *Mol. Biol. Cell* **2023**, *34*, br20. [[CrossRef](#)]
147. Qin, W.; Myers, S.A.; Carey, D.K.; Carr, S.A.; Ting, A.Y. Spatiotemporally-Resolved Mapping of RNA Binding Proteins via Functional Proximity Labeling Reveals a Mitochondrial MRNA Anchor Promoting Stress Recovery. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4980. [[CrossRef](#)]
148. Kehrer, J.; Pietsch, E.; Ricken, D.; Strauss, L.; Heinze, J.M.; Gilberger, T.; Frischknecht, F. APEX-Based Proximity Labeling in Plasmodium Identifies a Membrane Protein with Dual Functions during Mosquito Infection. *PLoS Pathog.* **2024**, *20*, e1012788. [[CrossRef](#)]
149. Bogaert, A.; Fijalkowska, D.; Staes, A.; Van de Steene, T.; Vuylsteke, M.; Stadler, C.; Eyckerman, S.; Spirohn, K.; Hao, T.; Calderwood, M.A.; et al. N-Terminal Proteoforms May Engage in Different Protein Complexes. *Life Sci. Alliance* **2023**, *6*, e202301972. [[CrossRef](#)]
150. Lutomski, C.A.; Bennett, J.L.; El-Baba, T.J.; Wu, D.; Hinkle, J.D.; Burnap, S.A.; Liko, I.; Mullen, C.; Syka, J.E.P.; Struwe, W.B.; et al. Defining Proteoform-Specific Interactions for Drug Targeting in a Native Cell Signalling Environment. *Nat. Chem.* **2025**, *17*, 204–214. [[CrossRef](#)]
151. Po, A.; Evers, C.E. Top-Down Proteomics and the Challenges of True Proteoform Characterization. *J. Proteome Res.* **2023**, *22*, 3663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Masuda, R.; Phyu Thant, K.P.; Kawahara, K.; Oki, H.; Kadonosono, T.; Kobayashi, Y.; Koide, T. A Yeast Two-Hybrid System to Obtain Triple-Helical Ligands from Combinatorial Random Peptide Libraries. *J. Biol. Chem.* **2024**, *300*, 107794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Lee, C. Coimmunoprecipitation Assay. *Methods Mol. Biol.* **2007**, *362*, 401–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Naki, M.; Gourdomichali, O.; Zonke, K.; Kattan, F.G.; Makridakis, M.; Kontostathi, G.; Vlahou, A.; Doxakis, E. APEX2-Mediated Proximity Labeling Resolves the DDIT4-Interacting Proteome. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5189. [[CrossRef](#)]
155. Ahamed, M.; Jaisinghani, N.; Li, M.; Winkeler, I.; Silva, S.; Previti, M.L.; Seeliger, J.C. Optimized APEX2 Peroxidase-Mediated Proximity Labeling in Fast- and Slow-Growing Mycobacteria. *Methods Enzymol.* **2022**, *664*, 267–289. [[CrossRef](#)]
156. Kao, A.; Chiu, C.; Vellucci, D.; Yang, Y.; Patel, V.R.; Guan, S.; Randall, A.; Baldi, P.; Rychnovsky, S.D.; Huang, L. Development of a Novel Cross-Linking Strategy for Fast and Accurate Identification of Cross-Linked Peptides of Protein Complexes. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*, M110.002170. [[CrossRef](#)]
157. Sherwood, L.J.; Hayhurst, A. Periplasmic Nanobody-Apex2 Fusions Enable Facile Visualization of Ebola, Marburg, and M \ddot{e} ngl \grave{a} Virus Nucleoproteins, Alluding to Similar Antigenic Landscapes among Marburgvirus and Dianlovirus. *Viruses* **2019**, *11*, 364. [[CrossRef](#)]
158. Ariotti, N.; Hall, T.E.; Parton, R.G. Correlative Light and Electron Microscopic Detection of GFP-Labeled Proteins Using Modular APEX. *Methods Cell Biol.* **2017**, *140*, 105–121. [[CrossRef](#)]
159. G \ddot{o} ös, H.; Kinnunen, M.; Salokas, K.; Tan, Z.; Liu, X.; Yadav, L.; Zhang, Q.; Wei, G.H.; Varjosalo, M. Human Transcription Factor Protein Interaction Networks. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 766. [[CrossRef](#)]
160. Kim, D.I.; Cutler, J.A.; Na, C.H.; Reckel, S.; Renuse, S.; Madugundu, A.K.; Tahir, R.; Goldschmidt, H.L.; Reddy, K.L.; Hugarir, R.L.; et al. BioSITE: A Method for Direct Detection and Quantitation of Site-Specific Biotinylation. *J. Proteome Res.* **2018**, *17*, 759–769. [[CrossRef](#)]
161. Zhong, X.; Li, Q.; Polacco, B.J.; Patil, T.; Marley, A.; Foussard, H.; Khare, P.; Vartak, R.; Xu, J.; DiBerto, J.F.; et al. A Proximity Proteomics Pipeline with Improved Reproducibility and Throughput. *Mol. Syst. Biol.* **2024**, *20*, 952–971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Dumrongprechachan, V.; Salisbury, R.B.; Soto, G.; Kumar, M.; MacDonald, M.L.; Kozorovitskiy, Y. Cell-Type and Subcellular Compartment-Specific APEX2 Proximity Labeling Reveals Activity-Dependent Nuclear Proteome Dynamics in the Striatum. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Shin, S.; Lee, S.Y.; Kang, M.G.; Jang, D.G.; Kim, J.; Rhee, H.W.; Kim, J.S. Super-Resolution Proximity Labeling with Enhanced Direct Identification of Biotinylation Sites. *Commun. Biol.* **2024**, *7*, 554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Choudhury, R.; Venkatasubramani, A.V.; Hua, J.; Borsò, M.; Franconi, C.; Kinkley, S.; Forné, I.; Imhof, A. The Role of RNA in the Maintenance of Chromatin Domains as Revealed by Antibody-Mediated Proximity Labelling Coupled to Mass Spectrometry. *eLife* **2024**, *13*, e95718. [[CrossRef](#)]

165. Roux, K.J.; Kim, D.I.; Raida, M.; Burke, B. A Promiscuous Biotin Ligase Fusion Protein Identifies Proximal and Interacting Proteins in Mammalian Cells. *J. Cell Biol.* **2012**, *196*, 801–810. [[CrossRef](#)]
166. Kim, D.I.; Jensen, S.C.; Noble, K.A.; Kc, B.; Roux, K.H.; Motamedchaboki, K.; Roux, K.J. An Improved Smaller Biotin Ligase for BioID Proximity Labeling. *Mol. Biol. Cell* **2016**, *27*, 1188–1196. [[CrossRef](#)]
167. Birnbaum, J.; Scharf, S.; Schmidt, S.; Jonscher, E.; Maria Hoeijmakers, W.A.; Flemming, S.; Toenhake, C.G.; Schmitt, M.; Sabitzki, R.; Bergmann, B.; et al. A Kelch13-Defined Endocytosis Pathway Mediates Artemisinin Resistance in Malaria Parasites. *Science* **2020**, *367*, 51–59. [[CrossRef](#)]
168. Branon, T.C.; Bosch, J.A.; Sanchez, A.D.; Udeshi, N.D.; Svinkina, T.; Carr, S.A.; Feldman, J.L.; Perrimon, N.; Ting, A.Y. Efficient Proximity Labeling in Living Cells and Organisms with TurboID. *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36*, 880–898. [[CrossRef](#)]
169. Kido, K.; Yamanaka, S.; Nakano, S.; Motani, K.; Shinohara, S.; Nozawa, A.; Kosako, H.; Ito, S.; Sawasaki, T. AirID, a Novel Proximity Biotinylation Enzyme, for Analysis of Protein–Protein Interactions. *eLife* **2020**, *9*, e54983. [[CrossRef](#)]
170. Schaack, G.A.; Sullivan, O.M.; Mehle, A. Identifying Protein–Protein Interactions by Proximity Biotinylation with AirID and SplitAirID. *Curr. Protoc.* **2023**, *3*, e702. [[CrossRef](#)]
171. Schiapparelli, L.M.; McClatchy, D.B.; Liu, H.H.; Sharma, P.; Yates, J.R.; Cline, H.T. Direct Detection of Biotinylated Proteins by Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 3966–3978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Li, Y.; Liu, K.; Zhou, Y.; Yang, J.; Zou, P. Protocol for Proximity-Dependent Proteomic Profiling in Yeast Cells by APEX and Alk-Ph Probe. *STAR Protoc.* **2020**, *1*, 100137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Gutierrez-Rus, L.I.; Vos, E.; Pantoja-Uceda, D.; Hoffka, G.; Gutierrez-Cardenas, J.; Ortega-Muñoz, M.; Risso, V.A.; Jimenez, M.A.; Kamerlin, S.C.L.; Sanchez-Ruiz, J.M. Enzyme Enhancement Through Computational Stability Design Targeting NMR-Determined Catalytic Hotspots. *J. Am. Chem. Soc.* **2025**, *147*, 14978–14996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Tomasello, G.; Armenia, I.; Molla, G. The Protein Imager: A Full-Featured Online Molecular Viewer Interface with Server-Side HQ-Rendering Capabilities. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 2909–2911. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.