THALES KRONENBERGER

**Implicações estruturais de mutantes da piridoxal quinase de
*Plasmodium falciparum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

THALES KRONENBERGER

Implicações estruturais de mutantes da piridoxal quinase de
Plasmodium falciparum

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Carsten Wrenger

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Kronenberger, Thales.

Implicações estruturais de mutantes da piridoxal quinase de
Plasmodium falciparum / Thales Kronenberger. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Carsten Wrenger.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de
concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de
pesquisa: Metabolismo de vitaminas em parasitas.

Versão do título para o inglês: Structural implication of mutants of the
pyridoxal kinase from *Plasmodium falciparum*.

1. Dinâmica molecular 2. Malária 3. Modelagem molecular
4. Piridoxal quinase 5. Vitamina B6 I. Wrenger, Prof. Dr. Carsten
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0213/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Thales Kronenberger.

Título da Dissertação: Implicações estruturais de mutantes da piridoxal quinase de
Plasmodium falciparum.

Orientador(a): Prof. Dr. Carsten Wrenger.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 510/12 referente ao projeto intitulado: "*Implicações estruturais de mutantes da piridoxina quinase de Plasmodium falciparum e investigação das suas regiões espaçadoras*" sob a responsabilidade de **Thales Kronenberger**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 29 de fevereiro de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Trabalho realizado com auxílios financeiros
concedido pela Fundação de Amparo a
Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente ao Professor Carsten Wrenger por me aceitar em seu laboratório e me orientar em todas as fases do projeto, assim como constantemente gerar oportunidades para minha melhora pessoal como pesquisador.

À todos os meus parceiros de laboratório do *Unit for Drug Discovery* pela convivência diária e auxílio direto e indireto nos experimentos. Em particular ao Marcell Crispim com os auxílios com as etapas de atividade enzimática, Kamila A. Meissner pelo auxílio em biologia molecular e a Flávia M. Zimbres por me introduzir pacientemente nas bases laboratoriais.

Ao Professor Antônio Sérgio Kimus Braz (da UFABC - Brasil) e sua aluna Patrícia Tufanetto, assim como todos de sua equipe, pelas sugestões e direcionamentos durante as etapas *in silico* do projeto e durante o estabelecimento desta linha em meu laboratório atual.

Agradeço aos pesquisadores do *Bernhard Nocht institute for tropical medicine* (Alemanha), em especial à Dr^a Ingrid Müller e Dr^a Julia Knöckel pelos plasmídeos e linhagens celulares utilizados nesse trabalho, assim como pelo início dos referenciais teóricos, sem os quais esse trabalho não seria possível.

Ao Professor Matthew R. Groves (Universidade de Groningen – Holanda) por fornecer a estrutura tridimensional cristalografada da *PfPdxK* sem a qual esse trabalho também não seria possível.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

À todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia (ICB-USP) pelo apoio e convivência.

RESUMO

Kronenberger T. Implicações estruturais de mutantes da piridoxal quinase de *Plasmodium falciparum*. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A malária é uma parasitose mortal que anualmente causa milhões de mortes em países tropicais e sub-tropicais. Ainda não existe uma vacina clinicamente disponível e as populações parasitas apresentam resistência contra quase todos os antimaláricos disponíveis. O metabolismo de vitaminas já é um alvo terapêutico consagrado, como no caso da vitamina B9, mas a vitamina B6 (o piridoxal e seus vitâmeros) tem sido validada também como importante para o parasita. Esse trabalho analisa bioquímica- e estruturalmente mutantes da enzima piridoxal quinase, envolvida na interconversão de piridoxal à piridoxal 5'-fosfato, por meio da combinação de análises *in silico* de modelagem e dinâmica molecular, associadas a ensaios bioquímicos de atividade enzimática. Modelos estruturais da PdxK de *P. falciparum*, tipo selvagem, permitiram a localização do sítio ativo assim como da região de interface de dimerização da proteína. Com base nesses dados foram sugeridas mutações sítio dirigidas que alterassem esses resíduos a fim de investigar a importância dessas regiões. As análises de dinâmica molecular sugerem que a dimerização é responsável pela estabilidade da região do sítio ativo, o que é coerente com a diminuição da atividade enzimática na maioria das mutantes relacionadas. Surpreendentemente duas mutações na interface levaram a um aumento da atividade enzimática, uma delas (F25Y) reduzindo a afinidade da enzima pelo piridoxal, entretanto a outra (F14W) mostra uma melhora na eficiência enzimática. Ensaio de filtração em gel mostraram um equilíbrio entre a conformação monomérica e dimérica da *PfPdxK* e portanto as mutações na interface não estão diretamente relacionadas a estabilização do estado dimérico, mas estariam envolvidas com a estabilização do *folding* da região do sítio ativo. A região do sítio ativo é recoberta por uma tampa que impede a auto-hidrólise do ATP, há também um resíduo serina (S11) que estabiliza a conformação do piridoxal durante a catálise, as mutações em ambas as regiões levaram a perda da atividade enzimática. A hipótese de que a interação da *PfPdxK* com ligantes de RNA não se mostrou conclusiva.

Palavras-chave: Dinâmica molecular. Malária. Modelagem molecular. Piridoxal quinase. Vitamina B6

ABSTRACT

Kronenberger T. Structural implication of mutants of the pyridoxal kinase from *Plasmodium falciparum*. [Masters thesis (Host-Pathogen Relationship Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Malaria is a deadly infectious disease of which annually more than half a million people especially in the tropics die. Currently there are no potent vaccines available and parasite is developing drug-resistance to the most antimalarials. The vitamin metabolism has already been exploited as drug-target as demonstrated by the folate (vitamin B9) metabolism. Recently the vitamin B6 (pyridoxal and other 5itâmeros) has also been validated to be druggable in the malaria parasite. We already analysed biochemically and structurally the plasmodial dimeric pyridoxal kinase, which is involved in the vitamin B6 interconversion pathway catalysing the phosphorylation of B6 vitamers. Our approach combines *in silico* molecular dynamics and modelling with mutagenic analysis of the respective enzyme in order to verify the oligomeric state as well as the catalytic activity of the PdxK in comparison to the respective wild-type protein. The crystal structure and models of *Pf*PdxK allowed us to determine the localisation of the active site as well the interface between the two monomers and to identify the involved amino acid residues. By apply molecular dynamics it became clear that the dimerization of the PdxK is importance for the stability of the active site, which was confirmed by the decrease of activity of mutants related to this region. Interestingly, two interface mutations increased the activity: i) F25Y and ii) F14W. Gel filtration assays revealed an equilibrium of the monomer-dimer conformation and therefore the decrease in activity of the interface mutations might not be directly related to the dimerization processes, but rather to the stabilization of the active site organisation. Within the active site region the serine (S11) is involved in the maintenance of the conformation of pyridoxal during catalyses and the identified lid region covering the ATP binding site is responsible for preventing auto-hydrolysis. Substitution of the respective amino acid residues to alanine resulted in enzyme inactivation. *In silico* analysis of the *Pf*PdxK spacer region identified nucleic acid binding sides, however RNA binding experiments failed so far and the interesting possibility of protein-RNA- binding remains for elucidation.

Keywords: Malaria. Molecular dynamics. Molecular modelling. Pyridoxal kinase. Vitamin B6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica da malária	15
Figura 2 – Ciclo de vida do parasita da malária	16
Figura 3 – Estrutura química dos vitâmeros da vitamina B6	18
Figura 4 – Esquema simplificado do metabolismo de vitamina B6 em <i>P. falciparum</i>	20
Figura 5 – Mecanismo de formação da base de Schiff em enzimas dependentes de PLP ..	24
Figura 6 – Estrutura química dos pró-fármacos	25
Figura 7 – Mecanismo de ação de pró-fármacos na piridoxal quinase em <i>P. Falciparum</i> .	26
Figura 8 – Esquema geral mostrando o funcionamento de um algoritmo de dinâmica molecular.....	29
Figura 9 – Fluxograma de experimento de <i>pull-down</i> adaptado para o sistema da <i>PfPdxK</i>	39
Figura 10 –Alinhamento de sequência de aminoácidos	41
Figura 11 – Modelo estrutural da <i>PfPdxK</i>	43
Figura 12 –Gráfico de Ramachandran.....	44
Figura 13 – Mobilidade média (em nm) da <i>PfPdxK</i> e seus diferentes mutantes.....	46
Figura 14 – Medições de variáveis ao longo da dinâmica de termalização a fim de comprovar o equilíbrio do sistema.....	48
Figura 15 – Variação de mobilidade da <i>PfPdxK</i>	50
Figura 16 – Variação de mobilidade entre mutantes da <i>PfPdxK</i> na região do sítio ativo ...	51
Figura 17 - Trecho em destaque do sequenciamento mostrando as mutações sítio dirigidas.....	52
Figura 18 – SDS-page da expressão purificada da <i>PfPdxK</i> tipo selvagem e mutantes.....	53
Figura 19 – Destaque da leitura dos diferentes reagentes envolvidos na reação enzimática.	54
Figura 20 – Formação do PLP é proporcional da quantidade de enzima	55
Figura 21 –Atividade da enzima WT- <i>PfPdxK</i> em comparação com suas mutantes	55
Figura 22 – Análise comparativa dos parâmetros cinéticos WT- <i>PfPdxK</i> e suas mutantes .	57
Figura 23 – Região do sítio ativo da <i>PfPdxK</i> e mutantes.....	58

Figura 24 –Curva de calibração para a filtração em gel	59
Figura 25 – <i>DotBlot</i> mostrando os pontos detectados em cada fração	60
Figura 26 – Gel de agarose com as etapas do processo de purificação do RNA.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl – microlitro

µM - micromolar

¹O₂ – Oxigênio singlete

4PEHz – 4' - fosfo-D-eritronihidrazida

ACT – Terapias baseadas em combinações de artemesinina

AdoMetDC – S-adenosilmetionina decarboxilase

ADP – difosfato de adenosina

AHT – anidrotetraciclina

ATP – trifosfato de adenosina

CHARMM - Chemistry at HARvard Molecular Mechanics

DEPC – dietil pirocarbonato

DLS – dynamic light scattering

DM – dinâmica molecular

DNA – ácido deoxiribonucleico

DOXP – 1-deoxi-D-xilulose 5'-fosfato

E.C. – classificação da enzima

EMBL – European molecular biology laboratory

EROs – espécies reativas de oxigênio

FPLC – fast protein liquid chromatography

GROMACS - GRONingen Machine for Chemical Simulations

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HSP90 – subunidade 90 da heat shock protein

IC₅₀ – concentração de inibição para 50% das formas

kDa – quiloDaltons

K_m – constante de Michaelis-Menten

mM – milimolar

MOPS – ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico

NCBI – National center for biotechnology and information

NM – modos normais

nm – nanômetros

NMR – ressonância magnética nuclear

ns – nanosegundos

NTA – Ácido trinitriloacético

ODC – ornitina decarboxilase

PBC – condições periódicas de fronteira

PDB – protein data bank

Pdx1 – Subunidade 1 da PLP-sintase

Pdx2 – Subunidade 2 da PLP-sintase

PdxH – PNP-oxidase

PdxK – Piridoxal quinase

*Pf*PdxK – piridoxal quinase de *Plasmodium falciparum*

pH – potencial hidrogênionico

PHME – piridoxil-histidina metil éster

PL – piridoxal

PLP – Piridoxal 5'-fosfato

PNP – piridoxina 5'-fosfato

ps – picosegundos

PT3 – éster de piridoxil-triptofano

PT5 – éster de piridoxil-triptofano

RMSD - root mean square deviation

RMSf – root mean square fluctuation

RNA – ácido ribonucleico

RPM – rotações por minuto

SDS - dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese de gel de poliacrilamida

SPC – single point charge

UNIPROT – Universal protein resource

VDW – van der waals

V_{max} – velocidade enzimática máxima

VMD – visual molecular dynamics

WT – tipo selvagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Malária – A doença e suas características	15
1.2 A vitamina B6: sua função, importância e vias de biossíntese.....	18
1.3 A via de interconversão da Vitamina B6 e o uso de pró-fármacos	22
1.4 Dinâmica molecular e desenho de novos fármacos.....	26
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODO	32
3.1 Modelagem e dinâmica molecular da PdxK tipo selvagem e suas mutantes	32
3.2 Mutagênese sítio dirigida, expressão recombinante e ensaios de atividade da PfPdxK	34
3.3 Identificação de possíveis ligantes associados à PfPdxK, focando em fragmentos de RNA em ensaios de <i>pull-down</i> com a proteína recombinante	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Modelagem e dinâmica molecular da PfPdxK tipo selvagem e suas mutantes.....	40
4.2 Mutagênese sítio dirigida do quadro aberto de leitura da PfPdxK, expressão recombinante da proteína mutante e ensaios de atividade.....	51
4.3 Identificação de possíveis ligantes associados à PfPdxK, focando em fragmentos de RNA em ensaios de <i>pull-down</i> com a proteína recombinante	60
5 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE A – Tabela de oligonucleotídeos empregados neste trabalho.....	71

APÊNDICE B – Targeting the vitamin biosynthesis pathways for the treatment of malaria	
.....	72
APÊNDICE C – Vitamin B6-dependent enzymes in the human malaria parasite <i>Plasmodium falciparum</i> - a druggable target?.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária – A doença e suas características

Malária é uma doença mortal causada pelos parasitas apicomplexos do gênero *Plasmodium*, transmitidos pela fêmea dos mosquitos do gênero *Anopheles*. Estima-se entre 300 e 500 milhões de novos casos anuais resultem em aproximadamente meio milhão de mortes em regiões endêmicas (1, 2), as quais correspondem à África, o sul da Ásia e a América Latina (3) (Figura 1). Os parasitas plasmodiais infectam uma grande variedade de vertebrados, mas apenas cinco espécies afetam humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. *P. knowlesi*, antes relatado como parasita de primatas não-humanos foi recentemente adicionado à esta lista (4). A forma mais severa e letal dessa infecção, denominada malária tropical, é causada pelo *P. falciparum* (5).

Figura 1 – Distribuição geográfica da malária no mundo

Mapa do mundo mostrando em azul escuro as regiões com alta incidência de malária e que contribuem mais para as mortes mundiais, em azul claro as regiões com baixa contribuição para os casos e mortes e, por fim, em salmão as regiões em que o controle e a eliminação estão estabelecidos (modificado de Alonso (6))

A transmissão do parasita ocorre através de um ciclo de vida complexo (Figura 2) que se inicia com o repasto sanguíneo da fêmea do vetor *Anopheles*, a qual inocula no hospedeiro vertebrado centenas de formas esporozoítas. Essas formas atravessam a pele, alcançando a corrente sanguínea, o que possibilita a sua migração ao fígado. Após a invasão dos hepatócitos o parasita se diferencia na forma merozoíta. Após um processo de replicação mitótica assexuada denominado esquizogônia, os hepatócitos se rompem,

liberando milhares de merozoítas novamente para a corrente sanguínea. No momento em que essas formas invadem as hemácias, inicia-se o ciclo intra-eritrocítico que se mantém por uma constante reprodução assexuada, acompanhada da diferenciação para formas intra-eritrocíticas: anel, trofozoíta maduro e esquizontes respectivamente. Neste momento, os eritrócitos são rompidas e os merozoítas jovens infectam novas hemácias. Durante esses ciclos de infecção, uma parcela de merozoítas originam as formas sexuadas: gametócitos feminino e masculino, que podem ser aspiradas pelo vetor quando este pica um hospedeiro infectado. No intestino do mosquito os gametas se diferenciam em o microgameta (masculino) e macrogameta (feminino) que se fundem gerando a forma móvel oocineto. O oocineto após sua maturação na membrana basal origina o oocisto, que se rompe liberando milhares de esporozoítos, que então migram para o epitélio da glândula salivar maturando para a forma infectiva e possibilitando assim o recomeço do ciclo (5).

Figura 2 – Ciclo de vida do parasita da malária

Destacado em vermelho a fase assexuada no hospedeiro humano, com o canto superior apontando as replicações hepáticas e o pequeno ciclo no canto inferior destacando a replicação intra-eritrocítica. Em azul a fase sexual no inseto vetor e os tempos médios dos processos (modificado de Delves (7)).

O parasita infecta preferencialmente órgãos vitais como o fígado, por meio de ciclos de proliferação celular, mas durante sua fase sanguícola pode causar inúmeras complicações em outros órgãos como o cérebro e o pulmão. A fonte comum de todas essas complicações é a fase intra-eritrocítica do parasita, que permite sua migração por todo o corpo do hospedeiro.

Vários fatores interferem no estabelecimento e eficiência tanto do tratamento como do controle dessa enfermidade. Podem ser incluídos nesse contexto a situação socioeconômica dos indivíduos afetados, ocorrência de alterações climáticas enfrentadas, o aumento de padrões migratórios de áreas endêmicas para não endêmicas, existência de sistemas de saúde humanizados e a presença de uma proposta vacinal eficiente. Soma-se ainda a rápida adaptação de parasitas a drogas em uso e a existência de insetos vetores resistentes a inseticidas (5).

O uso da cloroquina foi muito efetivo até que um alto grau de resistência ocorreu. O primeiro foco de resistência aconteceu na Tailândia, mas rapidamente se espalhou pela África e para toda a América do Sul.

A utilização combinada das tecnologias de biologia molecular, genômica funcional e descoberta de drogas *in silico*, auxiliam no processo de identificação e caracterização de novos alvos para intervenção quimioterápica.

Na descoberta de novos compostos com atividade antimalárica é importante considerar que essas drogas atinjam com maior eficiência o parasita causando mínimo efeito adverso ao hospedeiro humano. Consequentemente, as vias metabólicas específicas do parasita, como a biossíntese de vitaminas representam um alvo terapêutico ideal. O metabolismo da vitamina B9 (folato) do parasita da malária já é um alvo terapêutico reconhecido e enzimas chave desse sistema como a dehidrofolato redutase e a dihidropteroato sintase são preferencialmente exploradas (por exemplo, com inibidores clássicos tais a pirimetamina e o cicloguanil) e a dihidropteroato sintase (inibida por drogas da classe sulfa) (8).

Atualmente, apenas terapias com combinações baseados em artemesinina (*artemisinin-based combination therapies*, ACTs) estão entre os métodos de escolha para o tratamento da malária (3, 9, 10). Contudo, mesmo cepas resistentes a artemesinina já ocorreram (11). Portanto, há uma necessidade urgente na busca por novas estratégias no combate da doença.

1.2 A vitamina B6: sua função, importância e vias de biossíntese.

Alvos terapêuticos são comumente essenciais ao parasita e ausente nos hospedeiros e nesse sentido a biossíntese de vitaminas é um excelente alvo. De maneira geral as vitaminas são substâncias químicas essenciais na manutenção do metabolismo humano, seja atuando como antioxidantes (vitaminas C e E), fatores intermediários (vitamina K) ou mesmo como cofatores de reações enzimáticas, como no caso de todas as vitaminas do complexo B (12).

O termo vitamina B6 abrange de três diferentes vitâmeros: piridoxina, piridoxal e piridoxamina e suas respectivas formas fosforiladas (Figura 3). A forma ativa como cofator é o piridoxal 5'-fosfato (do inglês: *pyridoxal 5'-phosphate*, ou PLP), o qual está envolvido em centenas de reações enzimáticas distintas.

Figura 3 – Estrutura química dos vitâmeros da vitamina B6

a

b

Estruturas químicas dos vitâmeros da vitamina B6 e ao final a forma ativa fosforilada (PLP)

O PLP é majoritariamente requisitado em reações de decarboxilação e transaminação, que são sistemas enzimáticos essenciais para a manutenção do

metabolismo de aminoácidos (13) e que fundamentaram diversos estudos para a descoberta de novas drogas (14, 15).

Sabe-se que mamíferos são incapazes de sintetizar a vitamina B6 e, portanto são inteiramente dependentes da ingestão deste indispensável nutriente pela dieta. Em contraste, quase todas as bactérias, fungos e plantas possuem uma via de biossíntese de vitamina B6. Até o momento foram descritas duas vias diferentes para essa função: a via dependente e outra independente do composto 5-fosfato, 1-deoxi-D-xilulose (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate ou DOXP). A via dependente de DOXP é presente apenas em algumas γ -proteobactérias como *Escherichia coli* e leva à formação da piridoxina 5'-fosfato (PNP) (16-18), a qual deve ser subsequentemente oxidada à forma ativa, PLP, pela enzima PNP-oxidase (PdxH) (16).

Em contrapartida, a via independente de DOXP leva à direta formação do cofator na forma ativa. Esta via foi identificada em plantas, fungos e algumas bactérias, sendo originalmente proposta como um mecanismo de defesa a estresse oxidativo (19-24). Durante a síntese, as enzimas Pdx1 (também chamada de SNZ1 em leveduras) e Pdx2 (SNO1 em leveduras) utilizam a ribose 5-fosfato, gliceraldeído 3-fosfato e o aminoácido glutamina como substratos (24, 25) (Figura 4). Na presença da Pdx2, a glutamina é deaminada à glutamato gerando amônia, a qual é então, canalizada por um “túnel” na proteína até o sítio ativo da Pdx1 (26) onde é necessário para junto com os outros componentes formar o anel da PLP.

Figura 4 – Esquema simplificado do metabolismo de vitamina B6 em *P. falciparum*

Acima, a via de biossíntese de PLP em *P. falciparum*, baseada no complexo PLP-sintase (Pdx1 e Pdx2), levando a produção do PLP ativo. Destaque para o exemplo da enzima ornitina descarboxilase (ODC) que é PLP dependente. Abaixo a via de interconversão da vitamina B6 que recupera o piridoxal fosforilando-o a sua forma ativa, usando a enzima piridoxal quinase (PdxK). Mecanismo de inibidor com pró-drogas, a exemplo do PT3 na figura, realçado como atuante na via de interconversão e inibindo enzimas PLP dependentes (ODC) (modificado de Kronenberger (27), encontrado como Apêndice B)

Análises estruturais, referentes à composição oligomérica, de ambas as proteínas revelaram a formação de um complexo multimérico entre elas, essencial para a catálise, chamado de PLP sintase, consistindo de 12 subunidades Pdx1 em um centro na forma de coroa, decorados cada um com uma subunidade da Pdx2 (ou seja outras doze subunidades) (28-31).

No passado, experimentos de determinação, detectaram a presença da vitamina B6 como um metabólito em *P. falciparum* (32). Seguido de análises das enzimas que então estariam envolvidas, caracterização bioquímica e seguinte atribuição a uma via independente de DOXP (26, 33). Adicionalmente a via de biossíntese DOXP independente não é restrita apenas ao parasita da malária, sendo também demonstrada em outros parasitas apicomplexos como *T. gondii* (33, 34). Contudo, contrastando a Plasmodium e

Toxoplasma, análises das bases de dado genômica de Eimeria e Cryptosporidia, assim como outros organismos unicelulares patógenos (Trypanosoma e Leishmania) não revelaram correspondentes homólogas da Pdx1 e Pdx2, o que enfatiza que essa via de biossíntese não é abundante nos chamados protozoários. Essa exclusividade pode sugerir um papel essencial de um aporte extra de PLP para o metabolismo destes parasitas, conforme discutido por Knöckel e tratado adiante nesse trabalho (35).

Recentemente foi constatada a importância desse complexo enzimático e, portanto da via biossintética de PLP em *P. falciparum*. Conforme delineado acima, PLP é por um lado um cofator necessário para catálise enzimática de enzimas PLP-dependentes, mas também apresenta função na resistência ao estresse oxidativo. O parasita da malária invade e prolifera em células do hospedeiro humano e está, portanto, permanentemente exposto a espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais geram dano oxidativo (36). Níveis elevados de espécies reativas comumente são produtos da resposta imune do hospedeiro, usados no combate à infecção. Além disso, o próprio metabolismo de *Plasmodium* gerar EROs a partir de, por exemplo, digestão de hemoglobina humana nas fases intra-eritrocíticas do seu ciclo de vida. Durante o catabolismo da hemoglobina um número diferente de espécies reativas é gerado, que deve ser detoxificado, incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxil- e superóxido radicais assim como a altamente reativa molécula de oxigênio singlete (1O_2) (37).

O parasita possui uma imensa variedade de mecanismos para a defesa anti-oxidante e detoxificação (37-41), contudo nenhum deles se endereça especificamente à proteção contra 1O_2 em *P. falciparum* (33, 35), a qual tem sido atribuída à catálise da PLP-sintase, essa hipótese foi validada por meio de experimentos de interferência de proteínas usando parasitas modificados transgenicamente (35). Esta dupla função do PLP sublinha que a biossíntese de B6 em *P. falciparum* é importante para o parasita e verossímil para o desenvolvimento de drogas. Ainda nesse sentido diversas enzimas dependente de PLP são importantes alvos terapêuticos para drogas antiparasitoses, já em uso ou em desenvolvimento, conforme revisado por Kronenberger (42), encontrado em Apêndice C.

Dentre esses alvos destaca-se a aspartato aminotransferase, que atua na regulação dos níveis de amônio e na produção de aminoácidos, a ornitina decarboxilase (importante para a síntese de poliaminas, que são moléculas sinalizadoras) e a serina hidroximetiltransferase, que é um passo enzimático limitante para a biossíntese de folato,

um cofator fundamental para a síntese do DNA (42, para uma revisão completa das enzimas dependentes de PLP em parasitas).

O uso de um processo de desenho racional de drogas, por *docking in silico*, levou a descoberta de inibidores potenciais que se ligariam ao sítio ativo da Pdx1 plasmodial, os quais inibiram a atividade enzimática na recombinante (43). O composto líder derivado desse estudo foi o 4-fosfo D-eritronhidrazida (do inglês: 4-phospho-D-erythronhydrazide ou 4PEHz) foi subsequentemente testado em nível celular revelando um valor de IC₅₀ na ordem de 10 µM. Adicionalmente o modo de ação dessa droga foi validado utilizando uma linhagem celular de *P. falciparum* superexpressando a enzima PLP-sintase, que se tornou mais resistente a administração da 4PEHz em comparação com a linhagem celular simulada (transfectada com um plasmídeo vazio) (43). Esses resultados claramente validam a via de biossíntese como alvo terapêutico, embora estudos possam ser desenvolvidos em ordem de melhorar os compostos inibidores.

1.3 A via de interconversão da Vitamina B6 e o uso de pró-fármacos

Apesar da via de biossíntese de vitamina B6 estar presente no parasita da malária e, portanto não dependeria de fontes externas desse nutriente, *P. falciparum* porta adicionalmente uma via de interconversão dos vitâmeros da B6, que consiste de apenas uma enzima a piridoxal quinase (do inglês: pyridoxal kinase ou PdxK, ou ainda por seu E.C.: 2.7.1.35) (33, 44) (para visão geral da via ver Figura 4, trecho sobre a via de interconversão). A necessidade dessa via ainda não foi demonstrada e ainda não é descrita na literatura se o parasita da malária utiliza essa via para a fosforilação dos vitâmeros eventualmente importados (visto que a captação ainda não foi claramente demonstrada) ou para uma recaptação do piridoxal vindo da desfosforilação do PLP. Adicionalmente a isso se sabe que grande parte do PLP está ligada a proteínas como a albumina sérica e a hemoglobina (45) e, portanto menos acessível ao parasita.

A proteína recombinante PdxK já foi caracterizada bioquimicamente e aceita todos os três vitâmeros não-fosforilados como substrato, o ATP e também necessita de um íon divalente como cofator (Mg > Mn > Zn) (33).

As reações mediadas por enzimas PLP-dependentes são altamente diversas, contudo a formação inicial da base de Schiff, uma ligação dupla entre um nitrogênio (substituído por um ligante, não nitrogênio) e um carbono, entre o grupo aldeído do PLP e

um grupo amina de um aminoácido (lisina) é um intermediário comum a todas elas (Figura 5). A redução da base de Schiff leva a um aduto entre a coenzima e o substrato ligados covalentemente, que se assemelha a um estado de transição análogo com alta afinidade à apoproteína (46).

Figura 5 – Mecanismo de formação da base de Schiff em enzimas dependentes de PLP

Destacando a primeira etapa na qual o PLP se encontra covalentemente ligado a uma Lisina conservada em todas as enzimas PLP dependentes por meio da base de Schiff. O que suporta que um mecanismo de inibição irreversível das enzimas PLP dependentes por pro-fármacos (Adaptado de (47)).

A PdxK de *Plasmodium falciparum* revela uma massa molecular incomum, a qual é um terço maior que suas homólogas no gênero *Plasmodium*. Esta diferença de tamanho se refere a uma região espaçadora na sequência de aminoácidos da PdxK (33). A interrupção de proteínas por regiões espaçadoras é encontrada em várias proteínas plasmodiais como a S-adenosilmetionina descarboxilase e a ornitina descarboxilase (48, 49), contudo o papel fisiológico delas ainda é desconhecido.

Os insertos específicos são encontrados em pelo menos sete outras proteínas de *Plasmodium falciparum* como quinases, HSP90, RNA polimerases e a γ -glutamylcisteína sintetase (50-55). Estes insertos são caracterizados pela frequência de aminoácidos carregados e sua deleção leva a inativação da enzima – como demonstrado na AdoMetDC/ODC (56, 57). Postula-se que elas possam contribuir para o repertório antigênico do parasita e sua interação com – até agora indefinidas – proteínas regulatórias, ainda que em discussão (58-60).

A enzima PdxK e suas propriedades catalíticas já foram alvo para o desenvolvimento de pró-fármacos, que são precursores não-tóxicos (mimetizando o substrato da enzima, Figura 6) modificados pela enzima em sua forma tóxica (44).

Figura 6 – Estrutura química dos pró-fármacos

Três primeiras figuras mostram pró-fármacos com a estrutura semelhante ao piridoxal, mas acoplados na extremidade a um aminoácido, comparando com o PLP, forma ativa da vitamina B6 (modificado de (14, 15))

Há trinta anos, Heller et al. (1975) (61) sintetizaram vários fosfopiridoxil-aminoácidos que mimetizam a base de Schiff intermediária envolvida na descarboxilação enzimática. Entre estes, N-(5-fosfopiridoxil)-Ornitina inibiu a ODC em fígados de rato se ligando de maneira não competitiva à holoenzima, com referência do substrato ao cofator. Recentemente um novo análogo, um conjugado BOC-protégido da piridoxil-ornitina (POB), mostrou capacidade de inibir efetivamente a ODC humana em células, assim como o crescimento de tumores e células transformadas, enquanto que células não- tumor genicas foram menos afetadas (14). Outro análogo, piridoxil-histidina metil éster (PHME), foi capaz de inibir a histidina descarboxilase humana em mastocitomas sem afetar a proliferação (15).

Utilizando a mesma estratégia, mas especificamente para *P. falciparum* duas quimeras entre piridoxal-aminoácidos chamadas PT3 e PT5 (piridoxal-triptofano metil-ésteres, Figura 6) foram convertidos para suas respectivas formas fosforiladas pela *PfPdxK*, que então inibem as enzimas PLP-dependentes interrompendo diversos processos e levando o parasita a morte (Figura 7 para uma visão geral da estratégia) (44, 62) (Fig. 4).

Figura 7 – Mecanismo de ação de pró-fármacos na piridoxal quinase em *P. falciparum*

Descreve-se a ação dos pró-fármacos miméticos do PLP em etapas. A entrada de uma versão não-fosforilada e descarregada pelas membranas do eritrócito e do parasita adentrando o citoplasma. A *PfPdxK* atuaria então fosforilando o pró-fármaco no lugar do PL, sendo que esta versão fosforilada fica presa na célula do parasita devido a sua carga. Logo o análogo prossegue na sua ação como cofator e se liga covalentemente a enzima dependente de PLP, ela a inativa irreversivelmente, anulando sua função. As enzimas dependentes de PLP são essenciais para o metabolismo de aminoácidos do parasita e essa inibição leva a sua morte (estratégia originalmente descrita em (44), figura adaptada).

A aplicação desses compostos em nível celular revelou um efeito anti-proliferativo, que é pelo menos 8 à 10 vezes menos efetivo contra as células humanas (44), contudo experimentos adicionais são necessários para adquirir informações em nível de organismo. Recentemente, um trabalho com *high-throughput-screening* contra a Ornitina decarboxilase (ODC) de *T. brucei* descobriu uma série de inibidores com uma estrutura similar à PT3 (63).

A fim de avaliar o modo de ação no parasita foi empregada uma linhagem celular transgênica superexpressando a *PfPdxK*. Esta linhagem se mostrou mais suscetível a ação dos pró-fármacos, quando comparada com o controle com plasmídeo vazio, fato este que aponta a interação entre a *PdxK* e a ativação dos pró-fármacos (44).

1.4 Dinâmica molecular e desenho de novos fármacos

O processo de busca racional de novos quimioterápicos é extensivo e complexo, envolvendo partes de refinamento estrutural a fim de melhorar propriedades químicas, mas

também estudos sobre as particularidades do alvo terapêutico com o objetivo de melhorar a interação do fármaco com seu receptor.

Avanços tecnológicos na área de sequenciamento de nucleotídeos e aminoácidos permitem a determinação de genomas inteiros e associação com técnicas de biologia molecular, permitem o estudo da função de genes em diversos níveis, acelerando a descoberta e estudo de novos alvos terapêuticos. Apesar disso, a resolução da estrutura tridimensional de proteínas, seja por meio de cristalografia ou NMR, ainda permanece um desafio para casos particulares, além de representar um imenso gasto de recursos e tempo para a maioria dos casos (2).

Além disso, é sabido que a estrutura determinada por cristalografia de uma proteína fornece apenas uma visão estática, inclusive da interação com os ligantes presentes no momento do crescimento do cristal e, portanto estudos sobre os principais movimentos da proteína podem complementar as informações. Esse tipo de visão é um bom ponto de partida, mas não se adequa aos atuais modelos de encaixe induzido usado para explicar a atividade enzimática (64).

Sabe-se que no processo de desenvolvimento de novas drogas não existe um único caminho que apresente, determinística e precisamente, a melhor solução. Nesse sentido o uso de ferramentas computacionais como, por exemplo, o *docking*, a dinâmica molecular e os modelos QSAR, no desenho racional de drogas têm ganhado força nos últimos anos (2).

Especificamente para os casos em que há informações estruturais sobre a estrutura da proteína e sobre seu sítio ativo, a modelagem e a dinâmica molecular (DM) permitem acessar propriedades importantes. Com DM pode-se estudar o comportamento dinâmico da proteína em diferentes escalas temporais, o efeito do ligante, do solvente e de outras variações no microambiente simulado (como o pH e a concentração salina). Pode-se extrair valores teóricos de propriedades físico-químicas como dipolos, distâncias de ligação, energia e entropia (64).

DM baseia-se na exploração do espaço conformacional das proteínas pela resolução numérica de equações newtonianas ($F = m \cdot a$). Nesse cálculo a integração sucessiva do termo de aceleração é usada para prever a velocidade de cada átomo, algo que associado à posição inicial (comumente vinda de uma estrutura tridimensional resolvida experimentalmente ou de um modelo comparativo), permitindo prever os movimentos ao longo do tempo (Figura 8). Algoritmos como o de Verlet, ou modificações, são usados para a integração das equações de movimento (65, 66).

A aceleração é resultado de uma equação, que sumariza as variação de comprimento das ligações e a formação das interações químicas. Ao conjunto desses parâmetros chama-se campo de força, nele são sumarizados dados de cálculos quânticos e experimentais (espectroscopia), portanto chamam-se os cálculos baseados nesses parâmetros (e que não considerem os elétrons em sua totalidade) de métodos baseados em campos de força (67).

Tipicamente um campo de força empírico é composto de vários termos de energia, descrevendo interações ligadas e não-ligadas, de maneira geral apresentado na equação abaixo:

$$E = E \text{ ligação} + E \text{ torção} + E \text{ impróprio} + E \text{ eletrostática} + E \text{ vdw}$$

Destaca-se a partir daí os termos individuais e suas propriedades, respectivamente: a energia do comprimento da ligação em relação a um equilíbrio, a energia da torção e dobra das ligações e o ângulo de torção impróprio. Os últimos dois termos avaliam a interação eletrostática, calculada pela lei de Coulomb, assim como a repulsão e atração ente átomos pelas interações de Van der Waals (vdw), calculadas pelo potencial de Lennard-Jones (amplamente revisados em (67)).

Usualmente considera-se que a bioquímica de proteínas acontece em solventes aquosos, ou em interfaces relacionadas a esse, e o tratamento explícito do solvente tem sido uma estratégia para modelar os efeitos do mesmo no cálculo (68), ainda que existam alternativas de solventes implícitos modelados como um contínuo de potencial (69).

Em simulações com solvente explícito existe o problema do tempo computacional, visto que o tempo de simulação aumenta exponencialmente com a quantidade de átomos. Uma forma de lidar com o problema do tempo computacional é reduzi o número de átomos por meio de aproximações como: o tratamento dos hidrogênios não-polares como fusionados a átomos pesados e o estabelecimento de condições de contorno periódicas (*periodic boundary conditions*, PBC) para reduzir a quantidade de solvente necessária a solvatação da proteína.

Sobre os potenciais, sabe-se que o potencial de Lennard-Jones cai dramaticamente com o aumento da distância entre os átomos e, portanto simplificações como um *cut-off* pode ser aplicado. Contudo, nos potenciais eletrostáticos as interações de longa distância usualmente são tratadas com aproximações mais sofisticadas como a soma de Ewald ou o *particle-mesh Ewald method* (70).

Figura 8 – Esquema geral mostrando o funcionamento de um algoritmo de dinâmica molecular

Fluxograma mostrando o funcionamento de um algoritmo de dinâmica molecular, com a posição inicial dos átomos e sua mudança seguindo equações de movimento baseadas no cálculo da força, aceleração, velocidade e por fim movimento, levando a uma modificação das coordenadas dos átomos ao longo do tempo de simulação

Devido a sua versatilidade como técnica, a DM pode ser utilizada em associação a outras como, por exemplo, o *docking*, a fim de adquirir uma visão temporal usando como ponto de partida, poses e conformações de melhor estabilidade. Esta associação supre algumas lacunas no *docking* como a falta do efeito do solvente e da flexibilidade.

Apesar do mencionado a DM apresenta algumas desvantagens. O método é baseado em parâmetros de campos de força que, embora abarquem adequadamente a grande maioria das moléculas biológicas, carecem de valores para os ligantes mais incomuns. Em outros casos, apesar dos inúmeros avanços computacionais, dinâmicas extensas podem ser computacionalmente custosas e exigir longos períodos de cálculo, podendo ainda levar a problemas durante o cálculo caso a proteína fique presa em um mínimo de energia.

A qualidade da dinâmica molecular depende então da confiabilidade do modelo de entrada, da escolha acertada e acurácia tanto do campo de força quanto do *software* de

simulação, mas por fim fundamentalmente da competência do usuário (71). A associação desses fatores posiciona o uso de DM como não trivial (64).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse projeto de pesquisa foi analisar a PdxK do ponto de vista dinâmico, usando para isso sua estrutura estática conforme mencionado acima como base para métodos de dinâmica molecular e mutação sítio dirigida do quadro aberto de leitura clonado a fim de investigar bioquimicamente as mudanças previstas na conformação estrutural.

Outro foco é investigar as regiões espaçadoras internas, as quais interrompem a sequência primária da enzima. Ainda que a função delas seja desconhecida, sabe-se que sua deleção leva a uma redução ou mesmo perda completa da catálise enzimática (56). Além disso, para identificar possíveis ligantes associados com a região espaçadora, como proteínas ou ácidos nucleicos, experimentos *pull-down* com sistemas de transcrição *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

Delimitados temporalmente no cronograma:

- I) Análises bioinformáticas dos resíduos de aminoácidos que podem ser cruciais para a construção da interface entre as subunidades da proteína PdxK para verificar e confirmar as análises de cristalização por mutação sítio dirigida
- II) Mutagênese sítio dirigida da fase aberta de leitura da PdxK, expressão recombinante da proteína mutante, sua aplicação em gel de filtração e ensaios de atividade
- III) Identificação de possíveis ligantes associados à PdxK, focando em fragmentos de RNA em ensaios de *pull-down* com a proteína recombinante

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Modelagem e dinâmica molecular da PdxK tipo selvagem e suas mutantes

A estrutura da PdxK plasmoidal (*PfPdxK*) foi determinada por difração de raios-X em cristal e as coordenadas obtidas pela colaboração com Dr. Matthew R. Groves de *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) em Hamburgo, Alemanha, foram usadas como referência e as mutações levadas em consideração neste estudo foram selecionadas baseado em estudos anteriores ou analisadas por dinâmica molecular. O cristal já conta com a presença dos substratos ADP e PLP, assim como o cofator magnésio, nas regiões do sítio ativo.

Modelos para as proteínas mutantes foram desenvolvidos com auxílio do software Modeller 9.11 (72) usando como molde a estrutura cristalográfica. Para cada mutante foram desenvolvidos vinte modelos independentes com minimização de energia no vácuo por dinâmica molecular, inclusos no programa. O modelo de menor energia foi então selecionado para validação estérica em servidores online (ProCheck (73) e MolProbity (74)) e uso nas próximas etapas.

Algumas etapas de refinamento da estrutura e minimização de energia foram executadas em seu microambiente. Os cálculos serão efetuados com o campo de força GROMOS96 53a6 (75) usando o modelo de solvente explícito SPC (*simple point charge*) e contra-íons. O software utilizado para realizar as etapas acima descritas foi o GROMACS 4.5.5 (76).

O protocolo de minimização de energia seguirá os seguintes passos:

- 1º minimização por *steep descent* – com a proteína congelada;
- 2º minimização por *steep descent* – com o *backbone* restrito;
- 3º minimização por *steep descent* – com a proteína livre;
- 4º minimização por gradientes conjugados (com precisão dupla) – com a proteína livre.

Espera-se que na etapa inicial a proteína não modifique suas coordenadas ao longo do processo e que, portanto, ocorra a adaptação das moléculas de água ao seu redor e minimizando a energia do sistema permitindo que a água aumente sua entropia nas etapas seguintes. Na segunda etapa a minimização foi calculada com restrição de *backbone*, o esqueleto representado pelos aminoácidos sem suas cadeias laterais, para que houvesse

apenas minimização do restante da proteína. Esta etapa é uma aproximação importante, uma vez que o *backbone* da proteína apresenta menor mobilidade que o restante da molécula. A terceira etapa foi realizada com a proteína livre, para que haja uma minimização da proteína como um todo. Os dados derivados dessa etapa foram utilizados no cálculo de minimização por gradientes conjugados.

O método de minimização de energia por *steepest descent* foi utilizado para estipular conformações da molécula com mínimos energéticos locais. As informações obtidas através deste método também foram inseridas na última etapa de minimização energética, o cálculo por gradientes conjugados. Este método consiste no acúmulo de informações sobre a função de energia durante uma iteração que é usada para a modificação na próxima. O gradiente é calculado para cada passo de minimização e as informações coletadas pelas etapas anteriores de minimização são consideradas como informações adicionais a este cálculo, fazendo deste método o mais adequado para sistemas maiores, como é o caso. Os dados referentes aos números de passos necessários para a estabilização molecular em cada etapa foram analisados, por fornecerem mais parâmetros de comparação entre os diferentes mutantes e o tipo selvagem por meio dos Modos Normais.

Os Modos Normais de vibração de uma proteína (NM, usando o software CHARMM (77)), permitiram avaliar mudanças conformacionais na proteína por meio da resolução analítica da sua curva de potencial (espaço que apresenta as diferentes conformações em uma determinada temperatura). Quanto maior o número de vibrações, mais o sistema “aquece”, referente à maior mobilidade da proteína nesta região. O efeito contrário também é observado em regiões que apresentem um menor número de vibrações encontram-se mais “rígidas”. Como se pode ver, esta é uma análise comparativa, de modo que devem ser criadas matrizes que representem apenas a diferença dos modos normais dos mutantes pelo tipo selvagem.

Também foi determinado o movimento de regiões específicas durante a dinâmica através do cálculo da trajetória RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) e do mapa de densidade atômica. Além disso, as flutuações atômicas foram calculadas.

Após estas etapas os modos normais de vibração da proteína foram calculados, sendo armazenados em grupos de acordo com a tendência de movimentos apresentada por cada modo, sendo possível alinhar estes modos de forma a visualizar a tendência de movimento geral da proteína e dos respectivos mutantes. Visualizações das estruturas e

trajetórias para análises qualitativas serão feitas com o programa VMD (78) e com o programa PyMol (79).

Outra frente de trabalho foi analisar as mudanças conformacionais no tipo selvagem com e sem a presença do piridoxal (PL) e do ATP. Para isso foram modelados três sistemas: o primeiro contendo apenas a proteína (sem ATP, PL ou íons), o segundo íon magnésio coordenados com o ATP (conforme observado em outras estruturas já determinadas humana – pdb: 1RFV, *Trypanosoma brucei* – pdb: 3Z27 e ovelha – pdb: 1LHP) e o terceiro sistema com o acréscimo do PL. As cargas parciais nas estruturas do piridoxal e do ATP foram calculadas quanticamente com a antecâmara do Amber11(80) com aceleração GPU (81).

Em posse da estrutura minimizada foram executadas duas etapas de dinâmica molecular: i) 2 ns com o esqueleto da proteína com mobilidade reduzida para termalização (ajuste das variáveis de temperatura e pressão) e ii) 20 ns (podendo ser expansíveis de acordo com a necessidade de equilíbrio do sistema) com a proteína livre. Os dados dessa análise permitiram determinar as redes de interações entre os ligantes e resíduos da proteína (por meio da energia das interações de hidrogênio, hidrofóbicas e eletrostáticas), analisar diferenças de mobilidade e avaliar a diferença entre enzimas mutantes e o tipo selvagem, em etapas posteriores.

3.2 Mutagênese sítio dirigida, expressão recombinante e ensaios de atividade da PfPdxK

A observação da estrutura cristalográfica sugeriu três conjuntos de resíduos de aminoácidos para análises por mutação sítio dirigida: envolvidos com a dimerização (F25, F14, Q41, I36), com a interação com o PL (S11) e com a formação da tampa que cobre e estabiliza o ATP (I233, H234 e F235), sendo essas duas últimas sugeridas pela dinâmica molecular. Os respectivos oligonucleotídeos (*primers*, Todos as sequências de oligonucleotídeos utilizadas nesse trabalho são encontradas ao fim como material suplementar em formato de Tabela) foram desenhados para substituir os resíduos potencialmente envolvidos na dimerização da PdxK.

Tabela 1 – Organização das mutações sugeridas apontando a posição e a mudança

Número da Mutação	Resíduo Original – Posição – Mutado	Número da Mutação	Resíduo Original – Posição – Mutado
1	F 25 W	6	Q 41 A
2	F 25 Y	7	I 36 F
3	F 14 W	8	I 36 D
4	F 14 Y	9	S 11 A
5	Q 41 E	10	I 233 A, H 234 A, F 235 A

Os resíduos possivelmente relacionados com a interação entre os dímeros foram mudados para tanto resíduos carregados, como o glutamato ou aspartato, ou para resíduos volumosos como o triptofano, a fim de reduzir a superfície de interação ou mesmo separar as subunidades. Enquanto que as outras regiões sugeridas pela dinâmica molecular tiveram seus resíduos mudados para outros teoricamente inertes, como a alanina. A substituição do amino ácido original com o desejado será feita por um método de mutagênese sítio dirigida *in vitro* segundo (49).

Usando uma enzima DNA polimerase termoestável de alta fidelidade *Pfu*, pequeno número de ciclos e oligonucleotídeos desenhados para só copiar a fita molde parental de maneira linear, este método minimiza mutações em sítios secundários e não procurados, assim como a quantidade de mutantes geradas em um dia de procedimento.

Brevemente, os nucleotídeos mutagênicos, complementares a fita oposta do modelo de dupla-fita de DNA, foram estendidos pela *Pfu*-DNA polimerase durante um ciclo de amplificação. 35 ng de plasmídeo de expressão dupla-fita e *supercoiled* PfPdxK-IBA3 (33) e 100 ng dos primers senso e anti-senso serão usados em uma mistura de reação de 50 µl contendo desoxirribonucleotídeos, tampão de reação e *Pfu* polimerase, concordando com as recomendações do fabricante (Stratagene®, Santa Clara, Califórnia, EUA). Os parâmetros de ciclagem foram 95 °C por 30 s, 55 °C por 1 minuto e 68 °C por 8 minutos, em 17 ciclos, com o acréscimo de mais 1 µl de enzima no oitavo ciclo.

O produto da amplificação linear foi tratado com a endonuclease *DpnI* (Fermentas®, Vilnius, Lithuania) por 1 h para eliminar moldes parentais, visto que esta enzima é capaz de digerir especificamente DNA com metilações.

Subsequente a isso, uma alíquota de 15 µl dessa mistura de reação contendo o plasmídeo mutante duplamente entalhado será usado para a transformação de células de uma *E. coli* DH5-Alfa competente (Stratagene®). Os clones foram postos em cultura durante a noite em meio Luria-Bertani (LB) para extração e formação de estoque do

plasmídeo produzido, que então foi enviado para sequenciamento pelo método de Sanger e os dados analisados no programa BioEdit (Ibis BioSciences).

As eletroforeses do DNA para verificação da qualidade do DNA ocorreram em gel de agarose 1% (p/v) com tampão TAE 1x (0,04 M TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0 ajustado com ácido acético). Para visualização das bandas de DNA, foi adicionado brometo de etídeo ao gel, na proporção de 1:20 (v/v; µl/ml) na agarose. Nas amostras de DNA adicionou-se tampão de amostras (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol e 20% de glicerol). Os padrões de massa molecular utilizados foram: (i) 1 kb DNA *Ladder* (Fementas®); (ii) 1 kb *plus DNA Ladder* (Fementas®). Os géis foram visualizados no transiluminador sob fonte de luz ultravioleta (UV) e fotografados em sistema ImageQuant® 300 (GE Healthcare).

O protocolo de expressão seguiu após a análise dos mutantes pelo sequenciamento de seu sítio mutagênico respectivo. Os clones (colônias) cresceram um meio de cultura LB durante uma noite e a cultura foi diluída em uma proporção de 1:50, pela manhã crescida em 37°C até que a densidade ótica medida em 600 nm alcançar 0,5.

A expressão foi induzida com 200 ng/ml de anidrotetraciclina (AHT) e as células cresceram por 4 h adicionais em 37 °C antes da coleta, por centrifugação de 3.000x g por 10 minutos. Após isso o *pellet* será ressuspendido em tampão 10 mM de imidazol, 50 de fosfato de sódio dibásico e 300 mM de NaCl, pH 8. A fim de extrair a proteína esse pellet foi sonicado (com 15 pulsos de 30 segundos e um minutos no gelo) e então centrifugado em 50.000x g por 1 h.

O sobrenadante foi purificado utilizando a resina nitrilotriacético-Ni²⁺ (Ni-NTA Quiagen®, Hilden, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha), e tampões de lavagem: i) 20 mM de imidazol, 50 de fosfato de sódio dibásico e 300 mM de NaCl, pH 8 e ii) 100 mM de imidazol, 50 mM de fosfato de sódio dibásico e 300 mM de NaCl, pH 8. As frações de eluição foram coletadas após a adição de 5 ml de tampão de 250 mM de imidazol, 50 de fosfato de sódio dibásico e 300 mM de NaCl, pH 8.

O eluente da coluna de cromatografia por afinidade foi utilizado para a validação de seu tamanho e massa por meio de um gel desnaturante de SDS, o que também ajudou a guiar o processo de purificação, e utilizados para posterior ensaio enzimático. A concentração da proteína foi determinada pelos métodos de Bradford, com uma curva padrão de BSA e confirmado pelo uso do *nanodrop* (Spectrophotometer ND-1000, com coeficiente de extinção molar de 20.710 e tamanho de 58 kDa).

Para o tipo selvagem e cada tipo mutante foram realizados dois ensaios enzimáticos diferentes. O primeiro foi realizado com diferentes quantidades de enzima (50, 75 e 100 μg), 1 mM de piridoxal, 3 mM de ATP e 10 mM de MgCl_2 (descrito na literatura como o íon em que a enzima tem sua atividade máxima) em um tampão de 70 mM de fosfato dibásico. Esse ensaio permitiu verificar a dependência linear da reação pela quantidade de enzima, utilizado como controle.

O segundo ensaio variou a concentração do piridoxal entre 0 e 1 mM, sob as mesmas condições acima, importante para o cálculo dos parâmetros cinéticos da enzima do tipo selvagem e mutantes

Os valores de K_m para o substrato PL e $V_{\max}$ para a PdxK em *P. falciparum* e outros organismos (0,07 – 0,08 mM), contudo o dado foi obtido utilizando marcação radioativa.

A fim de determinar o tamanho da proteína em seu estado nativo foi usado o *Fast protein liquid chromatography* (FPLC) em uma coluna de Sephadex 200 (1,6 por 60 cm). O método se baseia em uma coluna com esferas de polissacarídeos ligados (dextran com epicloriglicina) semipermeáveis, nas quais a proteína se adere. Há um fluxo constante de tampão, que leva a separação da proteína dependendo do tempo de passagem, sendo coletadas frações de dois ml do tampão. O princípio é que moléculas menores terão sua difusão atrasada pela adsorção às esferas, enquanto que as maiores serão eluídas mais facilmente pela coluna, separando-as segundo o tamanho.

Para essa técnica foi utilizado um conjunto de proteínas com massa molecular conhecida e os seus perfis de eluição foram detectados. O número da fração em que saíram em maior quantidade foi utilizado na construção de uma reta de calibração. O tampão utilizado foi o mesmo da atividade enzimática com o acréscimo de 200 mM de KCl, pois sabe-se que sal extra interfere com a formação de aglomerados inespecíficos.

Após isso se seguiu a passagem de cada uma das proteínas mutantes e a WT em análises independentes, com as frações coletadas e analisadas quanto a presença de proteínas pelo método de Bradford e em caso positivos foram testadas com um *DotBlot* (com anticorpo contra a cauda de histidina). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Supported Nitrocellulose Membrane, Bio-Rad) utilizando o sistema de *DotBlot* (Bio-Rad). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S (0,1% diluído em ácido acético 10%) e descoradas em água corrente, possibilitando a avaliação da eficiência da transferência. As membranas foram bloqueadas por 2 horas com PBS-Tween20 0,3% com 5% de leite desnatado. Após o bloqueio, as

membranas foram incubadas com o anticorpo primário – anti-his Tag (1:1000) agitando por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente e depois lavadas três vezes por 5 minutos com PBS-Tween20 0,3%. Após, realizou-se a incubação durante 45 minutos com o anticorpo secundário, conjugado a enzima HRP (1:2.500) (*horseradish peroxidase* - GE Healthcare), seguido de lavagens como descrito acima. Subsequentemente, a revelação por quimiluminescência utilizando o reagente SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, de acordo com o manual do fabricante.

3.3 Identificação de possíveis ligantes associados à *PfPdxK*, focando em fragmentos de RNA em ensaios de *pull-down* com a proteína recombinante

Inicialmente os experimentos envolveram a passagem do RNA total do parasita *P. falciparum* por uma proteína imobilizada na matriz de strep-tactin, lavagem com PBS-DEPC e subsequente eluição. O RNA total foi purificado de uma cultura celular de eritrócitos.

O *pellet* de uma cultura de 50 ml de parasitas, parasitemia de 10%, foram centrifugados e lavados com PBS +0,2% de saponina em dois passos de centrifugação de 10 min à 3500 rpm. O *pellet* foi ressuscitado em 1 ml de TRIzol ® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 200 µl de clorofórmio e, após a homogeneização, centrifugado a 14.000 rpm por 20 min à 4°C. A fase líquida foi separada em um tubo estéril, acrescida de 600 µl de isopropanol, e incubada por 2 à 3h à -20°C. Após isso o tubo foi centrifugado por 30 min à 4°C em 14.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente descartado. Após seco à 37°C o *pellet* foi ressuscitado em 15 µl de água DEPC.

Outra abordagem levada em conta durante o trabalho foi o uso de oligonucleotídeos sintetizados artificialmente. Para esta etapa foi desenhado um oligonucleotídeo de DNA contendo uma região de vinte pares de bases aleatórios flanqueados por regiões constantes, no caso os promotores T7 (Figura 9). Usando esse fragmento como molde e o kit para transcrição *in vitro* (Script max thermo T7 transcription kit, Thermo Scientific®), seguindo as especificações do fabricante obtivemos o respectivo RNA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelagem e dinâmica molecular da *PfPdxK* tipo selvagem e suas mutantes

Primeiramente foi analisada a semelhança entre a estrutura primária das homólogas da PdxK em outras espécies do gênero *Plasmodium*, humana, *A. thaliana* e *E. coli*, por meio de um alinhamento da sequência de aminoácidos (Figura 10). Nota-se que apesar do alto grau de similaridade em toda a sequência, apenas a sequência de *P. falciparum* apresenta uma região espaçadora, rica em aminoácidos polares e carregados, não sendo ela conservada evolutivamente e com sua origem evolutiva ainda não resolvida.

Figura 10 – Alinhamento de sequência de aminoácidos

Alinhamento de aminoácidos entre a sequência humana (Hs), *A. thaliana* (At), *P. falciparum* (Pf - destacado), *P. vivax* (Pv), *P. knowlesi* (Pk), *P. berghei* (Pb) e *E. coli* (Ec). Destaque para a sequência de *P. falciparum* sua região espaçadora ausente nas homólogas

De acordo com o alinhamento e a literatura sobre a PdxK, ela apresenta uma região espaçadora que confere uma maior massa molecular quando comparada, por exemplo, com a homóloga humana (Figura 11a). Durante a modelagem da proteína tipo selvagem (WT) essa região se mostrou carregada e com alta mobilidade, preditos pelo programa Globplot 2.3 (82), (Figura 11b) e outros dados de *light scattering*, desenvolvidos em colaboração com o EMBL apontam para a ausência de estrutura secundária na região (dados não mostrados).

Portanto, a fim de facilitar o cálculo das dinâmicas moleculares posteriores a região espaçadora foi substituída por uma volta (*loop*) com cinco glicinas. Essa escolha é consistente com o fato da glicina ser um aminoácido muito móvel, pois não apresenta uma cadeia lateral volumosa que restrinja seus movimentos.

Conforme delineado anteriormente foram criados modelos tanto para a enzima WT quanto para as mutantes, substituindo apenas um dos aminoácidos por vez e calculados 20 réplicas ordenadas segundo a energia calculada pelo programa. Para cada mutante, a réplica de menor energia foi validada.

Os modelos foram validados por meio do gráfico de Ramachandran e pelos testes realizados no servidor online ProCheck (73), mostrando que estavam de acordo com o esperado do ponto de vista estérico (Figura 12) e com comprimentos de ligações esperados (dado não mostrado) respectivamente. Alguns poucos resíduos se mostram em regiões desfavoráveis segundo o gráfico de Ramachandran, como a Pro305, Ile604, Phe 307 e a Asp606, contudo suas cadeias laterais estão presentes no C-terminal da proteína não interferindo, nesse caso, no enovelamento.

Figura 11 – Modelo estrutural da *PfPdxK*

a) SDS-page comparando a massa de *HsPdxK* e *PfPdxK* b) localização da região espaçadora e medida da entropia de uma subunidade por meio dos gráficos do programa Globplot 2.3 c) Modelo estrutural da *PfPdxK* com cargas computadas, em destaque o modelo da região espaçadora, oculto nas etapas seguintes por excesso de mobilidade, como alças desestruturadas nas laterais.

Figura 12 –Gráfico de Ramachandran

Destacando os resíduos em regiões estericamente desfavoráveis. Resíduos destacados com o número e legenda estão em regiões desfavoráveis como, por exemplo, a Pro305, Ile604, Phe 307 e a Asp606, contudo as suas cadeias laterais estão presentes no C-terminal da proteína, naturalmente mais móvel.

Cada mutante teve a sua energia minimizada foi submetido à análise de modos normais e teve seu RMSD (*root mean square deviation*) avaliado de maneira independente do outro e normalizado pelo tipo selvagem (WT) (Figura 13a). Durante o cálculo também são retirados dados sobre o movimento médio individual de cada resíduo (RMSf) e isso foi usado para comparar as mutantes (Figura 13d para visualização gráfica, Figura 13b para os gráficos de mobilidade média e Figura 13c para os valores normalizados segundo a tipo selvagem).

Análises de modos normais (NMA) em uma proteína são uma resolução analítica da curva de potencial (espaço que apresenta as diferentes conformações em uma determinada temperatura) de uma proteína. Cada movimento é armazenado de acordo com sua frequência no sistema e pode ser usado para inferir as trajetórias reais de uma proteína, apesar de perder a visão sequencial e temporal da dinâmica do sistema. Averiguou-se que a PdxK WT possui dois grandes vetores de movimentos: i) a abertura e fechamento da tampa que cobre a cavidade catalítica, já mencionada acima como importante para a catálise e relacionada com a hidrólise do ATP e ii) um movimento de vibração entre as subunidades

com a porção superior da beta-folha, da interface, se movimentando próximo ao sítio ativo da proteína.

Figura 13 – Mobilidade média (em nm) da *Pf*PdxK e seus diferentes mutantes**a** **b** **c**

Com destaque para os sítios com aumento significativo de mobilidade. a) RMSD ao longo do tempo de dinâmica apontando o equilíbrio das mesmas b) gráfico de variação de mobilidade por resíduo (flutuação ou RMSf) para cada mutante, c) dados de variação de mobilidade normalizados de acordo com os valores da tipo selvagem e d) visualização na estrutura dos sítios e regiões com aumento significativo de mobilidade nas mutantes quando comparadas a tipo selvagem

Notou-se que as mutações que interferiam na interface de dimerização da proteína levavam a um aumento de flexibilidade nos resíduos abaixo do sítio ativo (Figura 13d). Isso aponta uma possível importância da dimerização para atividade enzimática, que será testada com a comparação entre a atividade enzimática do tipo selvagem e mutantes que separem as subunidades.

Outros testes foram às dinâmicas moleculares de diferentes sistemas WT (somente a proteína, com ATP e com ATP associado ao PL). A partir da estrutura minimizada há uma etapa de minimização de energia com o *backbone* da proteína congelado, que auxilia na estabilização da pressão e temperatura do sistema. Seguido de uma etapa longa de dinâmica de produção com a proteína livre (com aproximadamente 10 ns), cujos resultados filtrados serviram a análise e discussão.

As variáveis de pressão, temperatura (estabilizada a 310K, temperatura fisiológica) e energia (Figura 14) foram equilibradas durante esta quinta etapa o que permitiram a entrada na dinâmica de produção.

Figura 14 – Medições de variáveis ao longo da dinâmica de termalização a fim de comprovar o equilíbrio do sistema.

Flutuação das variáveis ao longo do tempo de dinâmica de equilibração: a) energia, permanecendo constante; b) temperatura (310 K ou 37° C como temperatura fisiológica); c) variação de RMSD e variação de pressão (d), também variando de um intervalo aceitável.

A etapa de dinâmica de produção mostra a variação de RMSD ao longo do tempo de cálculo e foi utilizado para determinar o *cut-off*, isto é, o tempo de dinâmica dentro de um desvio de erro aceitável e utilizado para determinar as propriedades físicas das moléculas. Foram calculados em média 10 a 20 ns de dinâmica molecular sendo desconsiderados os primeiros 3 ns por apresentar um desvio muito grande no RMSD e o restante utilizado para os cálculos de propriedades como o RMSf do esqueleto da proteína,

tempo de interação entre os resíduos e os ligantes (por meio de formação de pontes de hidrogênio e acessibilidade ao solvente).

Os resultados apontam um aumento global da mobilidade da proteína com a adição do ATP (Figura 15a para representação gráfica e Figura 15b para os gráficos de variação de RMSf), isso pode ser resultado de um redimensionamento devido ao acréscimo do ligante, que ocupa um espaço por si só. Contudo algumas regiões se mostram mais móveis em comparação a outras como, por exemplo, a região entre os resíduos 200 e 220. Essa região é a tampa que cobre o ATP e durante a simulação se torna menos móvel com a presença do ligante, impedindo a entrada de solvente e, portanto, a auto-hidrólise do ATP.

Análises com a dinâmica molecular comparando a enzima WT com a mutante com esse *loop* modificado e a S11A (Figura 16) apontam que a região oposta da tampa que cobre o sítio ativo se torna mais rígida nos mutantes, possivelmente num mecanismo compensatório ao aumento de mobilidade na tampa.

A estrutura de uma proteína pode apresentar duas tendências opostas. Por um lado, o processo enovelamento leva a minimização da sua energia, contudo por outro lado, as proteínas também podem se organizar a fim de reconhecer ligantes. A minimização de energia requer um bom empacotamento dos resíduos hidrofóbicos interiormente, os hidrofílicos expostos ao solvente na face externa. Contudo a fim de maximizar a função, a enzima pode expor resíduos hidrofóbicos ao solvente e destruir interações entre resíduos polares adequando à conformação do ligante. Essa aparente inconsistência entre a estabilidade completa e a atividade pode levar ao postulado de que: resíduos que contribuem para a catálise ou interação com ligantes, não são ótimos contribuintes para a estabilidade proteica.

Figura 15 – Variação de mobilidade da *PfPdxK***a** **b**

a) Foi utilizada a estrutura do esqueleto da *PfPdxK* sem ligantes como molde para mostrar a diferença entre a mobilidade na presença e ausência do piridoxal, resultados de dinâmicas moleculares independentes. Regiões com aumento de mobilidade estão destacadas em cores quentes e diminuição de movimento está apresentado em azul claro e verde. b) RMSD das dinâmicas na ausência e presença dos substratos normalizadas de acordo com a mobilidade da proteína sem ligantes

Figura 16 – Variação de mobilidade entre mutantes da *PfPdxK* na região do sítio ativo

- a) Gráfico de mobilidade relativa (RMSf) calculados por dinâmica molecular, comparando o tipo selvagem (WT) com as mutantes com modificação na tampa cobrindo o sítio ativo (*loop* modificado) e trocando S11A, b) destaque para os sítios com aumento de mobilidade quando comparados ao WT.

4.2 Mutagênese sítio dirigida do quadro aberto de leitura da *PfPdxK*, expressão recombinante da proteína mutante e ensaios de atividade

A fim de correlacionar as mudanças estruturais com a atividade enzimática da proteína, comparando-se as mutantes com o tipo selvagem, a proteína recombinante tipo selvagem foi submetida a mutação sítio dirigida e subsequente testes de atividade.

O protocolo de mutação sítio dirigida foi modificado de (33) com o acréscimo de uma porção extra de enzima após o oitavo ciclo, melhorando o rendimento das transformações levando a mais colônias positivas após o sequenciamento. As mutações foram confirmadas por sequenciamento (Figura 17).

Figura 17 - Trecho em destaque do sequenciamento mostrando as mutações sítio dirigidas

A porção superior mostra as mutações na interface entre as subunidades, enquanto que a porção inferior as mutações relacionadas a tampa (*lid*)

As enzimas mutantes embora não tenham diferenças de tamanho significativas em relação à WT poderiam ter diferenças no perfil de expressão e, portanto foram testadas individualmente. A Figura 17a mostra o perfil de purificação da WT-*PfPdxK* por meio de um gel de SDS-page, destaca-se a importância da lavagem com 100 mM de imidazol para a retirada de proteínas da *E. coli* que não são interessantes para o trabalho diminuindo a quantidade de bandas inespecíficas. A proteína se mostra em alta concentração após ser eluída com 250 mM de imidazol, mas não pura até a segunda eluição. Todas as proteínas mutantes apresentaram o mesmo perfil, com pequenas modificações na quantidade de proteína expressa e também na pureza das eluições.

A Figura 18b, por sua vez mostra as eluições individuais de cada mutante que já teve seu perfil de expressão determinado, com a mesma quantidade de amostra em cada canaleta.

Figura 18 – SDS-page da expressão purificada da *PfPdxK* tipo selvagem e mutantes**a** **b**

a) Perfil de purificação exemplo com a tipo selvagem e b) primeira eluição dos mutantes mostrando a diferença no perfil de expressão e também a manutenção do tamanho da proteína.

Para a medição da atividade enzimática foi escolhida a metodologia para a medição colorimétrica (por espectrofotometria) da formação de piridoxal-5'-fosfato (PLP) em 388 nm (Figura 19). Uma leitura em diferentes comprimentos de onda mostrou que essa é a melhor forma de acompanhara produção de PLP (Figura 19). Além disso, sabe-se que o coeficiente de extinção molar do PL, nesse comprimento de onda é na ordem de 4900 (M.cm)^{-1} , o que permite uma quantificação do produto formado (33).

O primeiro teste de atividade enzimática revelou que o aumento da quantidade absoluta de enzima é linearmente proporcional ao aumento da quantidade de produto sintetizada (Figura 20) assim como também se mostrou proporcional a concentração de substrato, saturando no intervalo de concentração entre 600 μ M de 1 mM de PL (Figura 21 e Tabela 2) para a maioria das mutantes, os resultados foram obtidos de pelo menos três ensaios independentes.

Figura 19 – Destaque da leitura dos diferentes reagentes envolvidos na reação enzimática.

Aponta-se para o aumento exclusivo de absorbância do PLP no comprimento de onda de 388 nm.

Figura 20 – Formação do PLP é proporcional da quantidade de enzima

a) Absorbância aumentando proporcionalmente em reação, com 50 µg (azul), 100 µg (verde) e 150 µg (vermelho). b) Demonstração da linearidade entre o aumento da enzima e da atividade

Figura 21 –Atividade da enzima WT-*Pf*PdxK em comparação com suas mutantes

c

a) F14W, F25Y; que apresentaram um aumento da atividade enzimática quando comparadas a WT b) F25W, F14Y Q41A, I36D e Q41E, mudanças na interface que levaram a diminuição da atividade enzimática e c) I36F e em diferentes concentrações de substrato. A mutante I36F, que não apresentou um perfil michaeliano de saturação, mesmo em altas concentrações de substrato.

Tabela2 – Diferenças de K_m (dado em μM) e V_{max} entre o tipo selvagem e as mutantes.

Valores	WT	F25Y	F14W	F25W	F14Y	Q41E	Q41A	I36D
V_{max} ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	0,04595	0,09271	0,1786	0,01134	0,009180	0,03817	0,01189	0,01370
K_m (μM)	335,3	516,8	354,5	484,8	143,0	400,3	261,4	636,9
Desvio Padrão								
V_{max}	0,003382	0,01117	0,01198	0,003317	0,001597	0,004155	0,002507	0,002459
K_m	56,05	125,0	56,22	292,2	90,73	90,84	149,1	203,0
R^2	0,9225	0,8813	0,9230	0,6027	0,2338	0,8825	0,4579	0,8025

Utilizando-se a concentração de saturação de 1 mM para abstrair a atividade específica do tipo selvagem e dos mutantes, comparativamente (Figura 22), nota-se que a mutante F25Y obteve um aumento sutil de atividade em relação ao tipo selvagem, mas possui um maior valor de K_m quando comparada ao tipo selvagem. Isso indicaria que a mutação apesar de aumentar a sua velocidade reduz sua afinidade ao substrato PL.

A mutante F14W aponta para um aumento claro na atividade enzimática, sem afetar significativamente seu valor de K_m , levando-nos a acreditar que essa mudança aumentaria dramaticamente a eficiência enzimática. A mutante F14W ainda que não esteja no sítio ativo está próxima a região de regulação e a mudança para um aminoácido de cadeia lateral

mais volumosa, pode interferir com a estrutura dessa região (Figura 23b). A mutante I36F, não apresentou um perfil michaeliano de saturação, mesmo em altas concentrações de substrato, portanto não houve cálculo de seus parâmetros cinéticos (Figura 23c).

Todas as outras mutantes relacionadas à interface da proteína apresentaram uma diminuição na atividade específica e, no caso extremo das mutações S11A e IHF(A) (relacionadas a ligação ao piridoxal e conformação do ATP) a atividade foi residual e quando normalizada, foi próxima a zero, o que aponta para a importância desses resíduos para a atividade enzimática (Figura 22 para comparação entre os parâmetros cinéticos e Figura 23a para visualização gráfica da posição desse resíduos na estrutura da PdxK).

Figura 22 – Análise comparativa dos parâmetros cinéticos WT-*PfPdxK* e suas mutantes

a) comparação dos valores de K_m das diferentes mutantes b) velocidade máxima referente às concentrações saturantes de 1mM para todas as enzimas, com exceção da I36F que não apresentou um perfil de atividade michaeliana. Nota-se também a redução da atividade das enzimas S11A e a IHF(A) a níveis insignificantes

Figura 23 – Região do sítio ativo da *PfPdxK* e mutantes

a) Com destaque para o resíduo catalítico D430 e o motif que mantém sua estrutura (GSG 431 à 433), respectivamente em roxo e azul. Em vermelho os resíduos mutados nesse trabalho S11A e sua interação de hidrogênio com o nitrogênio do anel do piridoxal (PL) e I421, H422 e F423, formando uma tampa que cobre o ATP. b) estrutura das mutantes F14W e F25Y destacando a sua proximidade com o sítio ativo

Inicialmente acreditava-se que as mutações estariam interferindo somente na dimerização da proteína, tornando-a um monômero e, portanto isso afetaria a catálise, esse cenário suporta-se na literatura. Descreve-se que proteínas oligoméricas dependem de uma grande área de superfície na interface entre as subunidades. Interfaces oligoméricas são comumente hidrofóbicas, embora seja aceitável que 1/5 de sua superfície seja carregada ou

hidrofílica (83). Há descrições de que as interfaces oligoméricas apresentam significativa simetria e complementação, além de que a interferência com isso poderia desfazer o complexo (84).

A fim de determinar o tamanho da proteína em seu estado nativo foi usado o *Fast protein liquid chromatography* (FPLC) em uma coluna de Sephadex. A curva de calibração obtida permitiu a inferência do tamanho da proteína e assim a determinação se ela está em seu estado dimérico ou monomérico (Figura 24).

Figura 24 –Curva de calibração para a filtração em gel

FPLC, coluna S200 com 1,6 cm por 60 cm com proteínas de tamanhos moleculares conhecidos ajustados sobre a fração em que saíram.

O *dotblot* da proteína WT (Figura 25) revelou um arrasto pela coluna mostrando sua saída entre as frações 38 e 44, apontando para uma variação de tamanho entre 112,4 e 40,5 kDa, lembrando que uma subunidade da WT-PfPdxK possui aproximadamente 58 kDa de tamanho, não permitindo identificar com precisão o estado de dimerização mesmo na proteína selvagem. Todos os ensaios com as proteínas mutantes apresentou o mesmo padrão para todas o que leva a acreditar que a PdxK está em um equilíbrio entre as formas de dímero e monômero. Sugere-se que as mutações interfiram nesse equilíbrio aumentando a quantidade de proteínas na forma monomérica o que reduziria a atividade enzimática.

Adicionalmente, a presença da proteína nas primeiras frações aponta para um estado de aglomeração inespecífico, que foi corroborado por experimentos de DLS (dados não apresentados) nas condições em que a proteína está ativa, os quais mostram um único pico com o tamanho de aproximadamente 30 nm.

Figura 25 –*DotBlot* mostrando os pontos detectados em cada fração

(anti-corpo contra cauda de histidina) Frações iniciais apresentando um estado oligomérico com uma grande quantidade da *PfPdxK* aglomerada. As frações 40 e 43 mostram respectivamente a saída das formas dimérica e monomérica da *PfPdxK*.

Os experimentos de filtração em gel apontam para um equilíbrio entre diferentes conformações, o que sugere que as mutações não afetam de maneira definitiva a dimerização. Ainda assim essas mutações atuam reduzindo a atividade enzimática. Uma hipótese para explicar esse fato é que as mutações podem alterar o enovelamento da região em que estão inseridas e a sua estrutura secundária. A interface entre as subunidades é composta de uma α -hélice que em sua face oposta é o sítio de interação do substrato PL e, portanto um afastamento ou desorganização alteraria a conformação do substrato na cavidade catalítica comprometendo a atividade (Figura 22b).

4.3 Identificação de possíveis ligantes associados à *PfPdxK*, focando em fragmentos de RNA em ensaios de *pull-down* com a proteína recombinante

Esses experimentos foram executados com a *PfPdxK* clonada em vetor IBA3 com uma cauda de seis histidinas. Os experimentos utilizando o extrato total do parasita assim como o mRNA total não foram bem sucedidos, acreditamos que devido a degradação durante as lavagens. Durante essa primeira os experimentos de interação foram realizados,

contudo os resultados obtidos da primeira vez não foram reprodutíveis e ainda permanecem inconclusivos.

O protocolo foi então modificado conforme descrito na metodologia para, no lugar do extrato do parasita, utilizar oligonucleotídeos aleatórios de 20 pares de bases ligados com extremidades conhecidas para o sequenciamento e verificar quais deles se ligariam a *PfPdxK* (a sequência exata está em anexo junto às outras nos materiais suplementares).

O kit de transcrição *in vitro* recomenda que o RNA seja produzido por uma incubação à 37°C por 8h, contudo nossos resultados apontaram que embora esse tempo seja adequado para o controle positivo fornecido, os pequenos fragmentos de RNA são gerados em maior quantidade até as primeiras 4h havendo depois um processo de degradação (Figura 26a). O gel de agarose durante o protocolo (Figura 26b) mostra a primeira passagem pela coluna (FT), mostrando que o RNA estava intacto após o contato com a proteína e as sucessivas lavagens (W1 – 4) com PBS-DEPC, um tampão não agressivo e estéril, corroborando que o RNA não degradou após a passagem da coluna. Aparentemente há uma grande perda de RNA nas sucessivas lavagens e, portanto após a eluição não houve RNA interagindo com a proteína, fato que foi verificado por transcrição reversa e verificação em gel do produto.

A região espaçadora da *PfPdxK*, assim como outras do mesmo organismo, é um mistério do ponto de vista funcional e ainda que a possibilidade de haverem ligantes contribuindo com papéis regulatórios, os experimentos de interação com RNA apresentam resultados negativos, apesar das diferentes abordagens empregadas.

Figura 26 – Gel de agarose com as etapas do processo de purificação do RNA

Possivelmente interagindo com a *PfPdxK*. Gel de agarose 2% diluída em MOPS para estudos de RNA a) Nota-se que embora o recomendado de 8h produza RNA a degradação faz com que optemos por 4h de incubação nesse estudo. b) Gel de agarose a primeira passagem pela coluna, mostrando que o RNA estava intacto após o contato com a proteína (FT) e as sucessivas lavagens (W1 – 4) com PBS-DEPC, um tampão não agressivo e estéril.

5 CONCLUSÕES

Diante do apresentado conclui-se que o estudo estrutural da PdxK de *Plasmodium falciparum* identificou algumas regiões importantes para a catálise e para a manutenção de sua forma, elucidando melhor seu mecanismo enzimático.

Sobre a enzima tipo selvagem, nota-se a presença de um resíduo de serina importante para a estabilização do substrato piridoxal (S11) que quando mutada para uma alanina leva a inativação da enzima. A região do sítio ativo apresenta uma tampa (*lid*, resíduos IHF) que cobre o ATP durante a catálise e impede sua auto-hidrólise, a interferência com essa região também inviabiliza a enzima. Análises de dinâmica molecular apontam que na presença de todos os substratos há uma diminuição da flexibilidade na tampa, visto que os resíduos interagem com o ATP.

A PdxK é majoritariamente um dímero e seu cristal permitiu a localização da interface entre as subunidades, que foi então, alvo de mutações. A interferência com a interface levou a diminuição da atividade enzimática na maioria dos casos, sem contudo alterar significativamente a dimerização da proteína. Dados de simulação apontam que nas mutantes há um aumento da flexibilidade, sugerindo desorganização, nos resíduos próximos ao sítio ativo, o que explicaria a diminuição da atividade enzimática.

Duas mutações na interface, contudo, aumentaram a atividade enzimática: i) F25Y que levou a redução à afinidade do piridoxal (K_m maior que a tipo selvagem) e a ii) F14W que aumentou a eficiência catalítica. Os ensaios de filtração em gel mostraram um equilíbrio entre as conformações monômero dímero e, portanto o aumento de atividade não estaria relacionado a isso, mas mais provavelmente está relacionado a manutenção da conformação. Por fim até onde se mostra a hipótese inicial de que a *PfPdxK* interagiria com RNA se mostrou negativa.

REFERÊNCIAS*

1. Burrows JN. Antimalarial drug discovery: where next? *Future Med Chem.* 2013; 4(18):2233-5.
2. Alonso H, Bliznyuk AA, Gready JE. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal research reviews.* 2006;26(5):531-68.
3. (WHO) WHO. World Malaria Report Geneva, Switzerland. 2011
4. Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern? *Braz J Infect Dis.* 2010; 14(3):299-309.
5. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1266-76.
6. Alonso PL, Tanner M. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. *Nature medicine.* 2013; 19(2):150-5.
7. Delves MJ, Ramakrishnan C, Blagborough AM, Leroy D, Wells TN, Sinden RE. A high-throughput assay for the identification of malarial transmission-blocking drugs and vaccines. *Int J Parasitol.* 2012; 42(11):999-1006.
8. Muller IB, Hyde JE. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. *Future Microbiol.* 2013; 5(12):1857-73.
9. Bhattarai A, Ali AS, Kachur SP, Martensson A, Abbas AK, Khatib R, et al. Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. *PLoS Med.* 2007; 6;4(11):e309.
10. Mahajan SS, Gut J, Rosenthal PJ, Renslo AR. Ferrous iron-dependent delivery of therapeutic agents to the malaria parasite. *Future Med Chem.* 2012; 4(18):2241-9.
11. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2009; 30;361(5):455-67.
12. Mahan LC E-SS, Raymond JL, Krause MV. Krause's Food & the Nutrition Care Process. 1a ed: ELSEVIER HEALTH SCIENCE; 2012. 1248 p.
13. Percudani R, Peracchi A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep.* 2003;4(9):850-4.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

14. Wu F, Christen P, Gehring H. A novel approach to inhibit intracellular vitamin B6-dependent enzymes: proof of principle with human and plasmodium ornithine decarboxylase and human histidine decarboxylase. *FASEB J.* 2011 ;25(7):2109-22.
15. Wu F, Gehring H. Structural requirements for novel coenzyme-substrate derivatives to inhibit intracellular ornithine decarboxylase and cell proliferation. *FASEB J.* 2009; 23(2):565-74.
16. Fitzpatrick TB, Amrhein N, Kappes B, Macheroux P, Tews I, Raschle T. Two independent routes of de novo vitamin B6 biosynthesis: not that different after all. *Biochem J.* 2007;407(1):1-13.
17. Roa BB, Connolly DM, Winkler ME. Overlap between *pdxA* and *ksgA* in the complex *pdxA-ksgA-apaG-apaH* operon of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1989;171(9):4767-77.
18. Lam HM, Tancula E, Dempsey WB, Winkler ME. Suppression of insertions in the complex *pdxJ* operon of *Escherichia coli* K-12 by *lon* and other mutations. *J Bacteriol.* 1992;174(5):1554-67.
19. Padilla PA, Fuge EK, Crawford ME, Errett A, Werner-Washburne M. The highly conserved, coregulated SNO and SNZ gene families in *Saccharomyces cerevisiae* respond to nutrient limitation. *J Bacteriol.* 1998;180(21):5718-26.
20. Osmani AH, May GS, Osmani SA. The extremely conserved *pyroA* gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J Biol Chem.* 1999; 13;274(33):23565-9.
21. Ehrenshaft M, Jenns AE, Chung KR, Daub ME. SOR1, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora fungi*, is highly conserved in divergent organisms. *Mol Cell.* 1998;1(4):603-9.
22. Ehrenshaft M, Bilski P, Li MY, Chignell CF, Daub ME. A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(16):9374-8.
23. Belitsky BR. Physical and enzymological interaction of *Bacillus subtilis* proteins required for de novo pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis. *J Bacteriol.* 2004;186(4):1191-6.
24. Raschle T, Amrhein N, Fitzpatrick TB. On the two components of pyridoxal 5'-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* 2005; 16;280(37):32291-300.
25. Burns KE, Xiang Y, Kinsland CL, McLafferty FW, Begley TP. Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway. *J Am Chem Soc.* 2005; 23;127(11):3682-3.
26. Gengenbacher M, Fitzpatrick TB, Raschle T, Flicker K, Sinning I, Muller S, et al. Vitamin B6 biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights. *J Biol Chem.* 2006; 10;281(6):3633-41.

27. Kronenberger T, Schettert I, Wrenger C. Targeting the vitamin biosynthesis pathways for the treatment of malaria. *Future Med Chem.* 2013;5(7):769-79.
28. Bauer JA, Bennett EM, Begley TP, Ealick SE. Three-dimensional structure of YaaE from *Bacillus subtilis*, a glutaminase implicated in pyridoxal-5'-phosphate biosynthesis. *J Biol Chem.* 2004; 23;279(4):2704-11.
29. Zhu J, Burgner JW, Harms E, Belitsky BR, Smith JL. A new arrangement of (beta/alpha)₈ barrels in the synthase subunit of PLP synthase. *J Biol Chem.* 2005;280(30):27914-23.
30. Zein F, Zhang Y, Kang YN, Burns K, Begley TP, Ealick SE. Structural insights into the mechanism of the PLP synthase holoenzyme from *Thermotoga maritima*. *Biochemistry.* 2006; 45(49):14609-20.
31. Strohmeier M, Raschle T, Mazurkiewicz J, Rippe K, Sinning I, Fitzpatrick TB, et al. Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(51):19284-9.
32. Cassera MB, Gozzo FC, D'Alexandri FL, Merino EF, del Portillo HA, Peres VJ, et al. The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 2004; 279(50):51749-59.
33. Wrenger C, Eschbach ML, Muller IB, Warnecke D, Walter RD. Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 2005; 280(7):5242-8.
34. Knockel J, Muller IB, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C. The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* generates pyridoxal phosphate de novo. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; 152(1):108-11.
35. Knockel J, Muller IB, Butzloff S, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C. The antioxidative effect of de novo generated vitamin B6 in *Plasmodium falciparum* validated by protein interference. *Biochem J.* 2012; 443(2):397-405.
36. Muller S, Kappes B. Vitamin and cofactor biosynthesis pathways in *Plasmodium* and other apicomplexan parasites. *Trends Parasitol.* 2007; 23(3):112-21.
37. Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol.* 2004; 34(2):163-89.
38. Nzila A, Ward SA, Marsh K, Sims PF, Hyde JE. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part I): pointers for malaria treatment from cancer chemotherapy. *Trends Parasitol.* 2005; 21(6):292-8.
39. Muller S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 2004;53(5):1291-305.

40. Muller S, Gilberger TW, Krnajski Z, Luersen K, Meierjohann S, Walter RD. Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protoplasma*. 2001; 217(1-3):43-9.
41. Rahlfs S, Schirmer RH, Becker K. The thioredoxin system of *Plasmodium falciparum* and other parasites. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(6):1024-41.
42. Kronenberger T, Lindner J, Meissner KA, Zimbres F, Sauer FM, Schetttert I, Wrenger C. Vitamin B6-dependent enzymes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* - a druggable target? *BioMed Research International (Especial Issue: PLP-Dependent Enzymes)*. 2013; *in press*.
43. Reeksting SB, Muller IB, Burger PB, Burgos ES, Salmon L, Louw AI, et al. Exploring inhibition of Pdx1, a component of the PLP synthase complex of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2013; 449(1):175-87
44. Muller IB, Wu F, Bergmann B, Knockel J, Walter RD, Gehring H, et al. Poisoning pyridoxal 5-phosphate-dependent enzymes: a new strategy to target the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 2009;4(2):e4406.
45. Friedrich W. *Vitamins*. Berlin: Walter de Gruyter; 1988. 1062 p.
46. Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem*. 2004;73(1):383-415.
47. Amadasi A, Bertoldi M, Contestabile R, Bettati S, Cellini B, di Salvo ML, et al. Pyridoxal 5'-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents. *Curr Med Chem*. 2007;14(12):1291-324.
48. Muller S, Da'dara A, Luersen K, Wrenger C, Das Gupta R, Madhubala R, et al. In the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, polyamines are synthesized by a bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase. *J Biol Chem*. 2000; 275(11):8097-102.
49. Wrenger C, Luersen K, Krause T, Muller S, Walter RD. The *Plasmodium falciparum* bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosyl-L-methionine decarboxylase, enables a well balanced polyamine synthesis without domain-domain interaction. *J Biol Chem*. 2001; 276(32):29651-6.
50. Kappes B, Tews I, Binter A, Macheroux P. PLP-dependent enzymes as potential drug targets for protozoan diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1814(11):1567-76.
51. Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J. Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(23):8360-4.

52. Bonnefoy S, Attal G, Langsley G, Tekaiia F, Mercereau-Puijalon O. Molecular characterization of the heat shock protein 90 gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 67(1):157-70.
53. Giesecke H, Barale JC, Langsley G, Cornelissen AW. The C-terminal domain of RNA polymerase II of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 180(3):1350-5.
54. Gilberger TW, Schirmer RH, Walter RD, Muller S. Deletion of the parasite-specific insertions and mutation of the catalytic triad in glutathione reductase from chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* 3D7. *Mol Biochem Parasitol*. 2000; 107(2):169-79.
55. Luersen K, Walter RD, Muller S. The putative gamma-glutamylcysteine synthetase from *Plasmodium falciparum* contains large insertions and a variable tandem repeat. *Mol Biochem Parasitol*. 1999; 98(1):131-42.
56. Birkholtz LM, Wrenger C, Joubert F, Wells GA, Walter RD, Louw AI. Parasite-specific inserts in the bifunctional S-adenosylmethionine decarboxylase/ornithine decarboxylase of *Plasmodium falciparum* modulate catalytic activities and domain interactions. *Biochem J*. 2004; 377(Pt 2):439-48.
57. Wells GA, Birkholtz LM, Joubert F, Walter RD, Louw AI. Novel properties of malarial S-adenosylmethionine decarboxylase as revealed by structural modelling. *J Mol Graph Model*. 2006; 24(4):307-18.
58. Kemp DJ, Coppel RL, Anders RF. Repetitive proteins and genes of malaria. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41(1):181-208.
59. Reeder JC, Brown GV. Antigenic variation and immune evasion in *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol Cell Biol*. 1996;74(6):546-54.
60. Schofield L. On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. *Parasitol Today*. 1991;7(5):99-105.
61. Heller JS, Canellakis ES, Bussolotti DL, Coward JK. Stable multisubstrate adducts as enzyme inhibitors. Potent inhibition of ornithine decarboxylase by N-(5'-phosphopyridoxyl)-ornithine. *Biochim Biophys Acta*. 1975; 403(1):197-207.
62. Muller IB, Hyde JE, Wrenger C. Vitamin B metabolism in *Plasmodium falciparum* as a source of drug targets. *Trends Parasitol*. 2010; 26(1):35-43.
63. Smithson DC, Lee J, Shelat AA, Phillips MA, Guy RK. Discovery of potent and selective inhibitors of *Trypanosoma brucei* ornithine decarboxylase. *J Biol Chem*. 2010; 285(22):16771-81.
64. Durrant JD, McCammon JA. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC biology*. 2011;9:71.

65. Leach AR. Molecular modelling. Principles and applications. 2nd Edition ed. Essex, United Kingdom: Pearson Education Ltd; 2001.
66. Hansson T, Oostenbrink C, van Gunsteren W. Molecular dynamics simulations. Current opinion in structural biology. 2002;12(2):190-6.
67. Mackerell AD, Jr. Empirical force fields for biological macromolecules: overview and issues. Journal of computational chemistry. 2004;25(13):1584-604.
68. Sagui C, Darden TA. Molecular dynamics simulations of biomolecules: long-range electrostatic effects. Annual review of biophysics and biomolecular structure. 1999; 28(1):155-79.
69. Ren P, Chun J, Thomas DG, Schnieders MJ, Marucho M, Zhang J, et al. Biomolecular electrostatics and solvation: a computational perspective. Quarterly reviews of biophysics. 2012; 45(4):427-91.
70. Lu X, Cui Q. Charging free energy calculations using the Generalized Solvent Boundary Potential (GSBP) and periodic boundary condition: a comparative analysis using ion solvation and oxidation free energy in proteins. The journal of physical chemistry B. 2013;117(7):2005-18.
71. van Gunsteren WF, Dolenc J, Mark AE. Molecular simulation as an aid to experimentalists. Current opinion in structural biology. 2008;18(2):149-53.
72. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis [et al]. 2006; Chapter 5:Unit 5 6.
73. Laskowski RA, Rullmannn JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. Journal of biomolecular NMR. 1996; 8(4):477-86.
74. Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta crystallographica Section D, Biological crystallography. 2010; 66(Pt 1):12-21.
75. Oostenbrink C, Villa A, Mark AE, van Gunsteren WF. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. Journal of computational chemistry. 2004; 25(13):1656-76.
76. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. Journal of computational chemistry. 2005 ; 26(16):1701-18.
77. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M, CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations, J. Comp. Chem. 1983; 4(1): 187-217

78. Hsin J, Arkhipov A, Yin Y, Stone JE, Schulten K. Using VMD: an introductory tutorial. Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis [et al]. 2008;Chapter 5:Unit 5 7.
79. Schrodinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. 2010.
80. Case DA, Cheatham TE, 3rd, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, Jr., et al. The Amber biomolecular simulation programs. Journal of computational chemistry. 2005; 26(16):1668-88.
81. Gotz AW, Williamson MJ, Xu D, Poole D, Le Grand S, Walker RC. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born. Journal of chemical theory and computation. 2012; 8(5):1542-55.
82. Linding R, Russell RB, Neduva V, Gibson TJ. GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. Nucleic acids research. 2003; 31(13):3701-8.
83. Eisenhaber F. Hydrophobic regions on protein surfaces. Derivation of the solvation energy from their area distribution in crystallographic protein structures. Protein science : a publication of the Protein Society. 1996; 5(8):1676-86.
84. Ali MH, Imperiali B. Protein oligomerization: how and why. Bioorganic & medicinal chemistry. 2005; 13(17):5013-20.

APÊNDICE A – Tabela de oligonucleotídeos empregados neste trabalho

Nome do oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
F25W sense	gtggaaataatatagcagcatttggagaaggagaggacatattc
F25W antissense	gaatatgtcctccttctccaaacgaatgctatattatttccac
F25Y sense	gtggaaataatatagcagcatttatagaaggagaggacatattc
F25Y antissense	gaatatgtcctccttctataaacgaatgctatattatttccac
F14W sense	ctccatacaatcacaaagtgtgggatggattttgtggaaataatatagc
F14W antissense	gctatattatttccacaaaatccatccacactgtgattgtatggag
F14Y sense	ctccatacaatcacaaagtgtatgatggattttgtggaaataatatagc
F14Y antissense	gctatattatttccacaaaatccatcacacactgtgattgtatggag
Q41A sense	ctaaaattctaaacacagtagcatattattcaaggtcaaacatag
Q41A antissense	ctatgtttgaactttgaataatatgctactgtgtttagaattttagg
Q41E sense	ctaaaattctaaacacagtagaatattattcaaggtcaaacatag
Q41E antissense	ctatgtttgaactttgaataatattctactgtgtttagaattttagg
I36D sense	gaaggagaggacatattcctaaattcctaaatctaaacacagtacaatattattc
I36D antissense	gaataatattgtactgtgtttagatcttttaggaatattgtcctctcctc
I36F sense	gaaggagaggacatattcctaaattcctaaatttctaaacacagtacaatattattc
I36F antissense	gaataatattgtactgtgtttagaaatttaggaatattgtcctctcctc
S11A sense	gaaaaaagatcaccacttccaaaacaattagcagcagcctttaaattttatattttaaataaac
S11A antissense	ccacaaaatccatcaaacacttgtgcttgatggagataatattttcc
IHF(A) sense	gtttattttaaatataaaaattttaaaggctgctgctaattgttttggagtggtgatcttttttc
IHF(A) antissense	gaaaaaagatcaccacttccaaaacaattagcagcagcctttaaattttatattttaaataaac
T7-NNN ₂₀ -T7	taatacgactcactatagggaga-NNN ₂₀ -ggatatcactcagcataat
T7 sense (sequenciamento)	taatacgactcactatagggaga
T7 antissense (sequenciamento)	attatgctgagtgatatccctct

APÊNDICE B – Targeting the vitamin biosynthesis pathways for the treatment of malaria

For reprint orders, please contact reprints@future-science.com

Targeting the vitamin biosynthesis pathways for the treatment of malaria

The most severe form of malaria is *Malaria tropica*, caused by *Plasmodium falciparum*. There are more than 1 billion people that are exposed to malaria parasites leading to more than 500,000 deaths annually. Vaccines are not available and the increasing drug resistance of the parasite prioritizes the need for novel drug targets and chemotherapeutics, which should be ideally designed to target selectively the parasite. In this sense, parasite-specific pathways, such as the vitamin biosyntheses, represent perfect drug-target characteristics because they are absent in humans. In the past, the vitamin B9 (folate) metabolism has been exploited by antifolates to treat infections caused by malaria parasites. Recently, two further vitamin biosynthesis pathways – for the vitamins B6 (pyridoxine) and B1 (thiamine) – have been identified in *Plasmodium* and analyzed for their suitability to discover new drugs. In this review, the current status of the druggability of plasmodial vitamin biosynthesis pathways is summarized.

Malaria is a deadly disease caused by the apicomplexan parasites *Plasmodium*, which is transmitted by the female mosquitoes of the genus *Anopheles*. It has been estimated that there are 300–500 million cases annually in the world resulting in more than half a million casualties in endemic regions [1], which mainly comprises Africa, South Asia and Latin America [1,2]. Malaria parasites are infective for a variety of vertebrates, but only four species are of importance for humans: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. A fifth species, *Plasmodium knowlesi*, has been recently added to the list, which was previously only known to infect non-human primates [3]. The most severe and lethal form of this infectious disease, *Malaria tropica*, is caused by *P. falciparum* [4]. Various factors compound the problem of the disease including socio-economic factors, global climate changes, increasing migration patterns, failing health care systems, the lack of an effective vaccine in the foreseeable future and most alarmingly, the rapid development and dispersal of the respective drug- and insecticide-resistant forms of the malaria parasite and the mosquito vector, respectively.

The use of chloroquine was effective until high level of drug resistance became apparent. The first resistance occurred in Thailand, but spread afterwards also to Africa and South America. Currently, artemisinin-based combination therapies are one of the leading methods to treat malaria [2,5,6]. However, even artemisinin-resistant strains are appearing [7]. It is, therefore, an urgent priority to initiate innovative strategies

to combat the disease. It is widely anticipated that the application of advanced molecular biological, functional genomics and *in silico* drug-discovery technologies would significantly enhance the identification and characterization of novel parasitic targets for chemotherapeutic intervention.

For the design of novel antimalarial compounds it is important that these drugs preferably target the parasite without harming the human host. Consequently, parasite-specific metabolic pathways, such as vitamin biosyntheses, represent ideal drug targets. The vitamin B9 (folate) metabolism of the malaria parasite has already been established as drug target [8]. However, in this review major attention will be drawn on the other vitamin biosynthetic pathways, vitamin B6, consisting of pyridoxal, pyridoxine, pyridoxamine and their respective phosphorylated forms, and vitamin B1 (thiamine) present in the malaria parasite.

Folate metabolic pathway

■ The plasmodial folate metabolism is an established drug target

As already outlined within the introduction section, the folate metabolism is already exploited for chemotherapeutical treatment of various infection disease, which also includes the malaria parasite [9–12]. Folate is an essential cofactor that is active in its completely reduced form (tetrahydrofolate) and involved in the one-carbon transfer reactions, such as uracil methylation or within DNA replication [13]. Animals, including humans, have to uptake this cofactor with

**Thales Kronenberger¹,
Isolmar Schettert²
& Carsten Wrenger^{*1}**

¹Unit for Drug Discovery, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-000 São Paulo-SP, Brazil

²Laboratory of Genetics & Molecular Cardiology, Heart Institute InCor, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 44, 05403-000 São Paulo-SP, Brazil

*Author for correspondence:

Tel.: +55 11 3091 7335

Fax: +55 11 3091 7417

E-mail: cwrenger@icb.usp.br

**FUTURE
SCIENCE**

part of
fsg

their diet; however, plants and bacteria are able to generate folate *de novo*. Apicomplexa, such as *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* possess a biosynthetic pathway in addition to their uptake capabilities [14].

The biosynthesis pathway in *P. falciparum* starts with the catalysis of the GTPCH, which is responsible for the conversion of GTP to 7,8-dihydroneopterin triphosphate (FIGURE 1). The latter enzyme has been proposed to be involved in resistance to antifolates by compensating mutations in the genes *dhps* and *dhfr* encoding for the DHPS and DHFR, respectively, due to an elevated copy number [15]. In the second step, the PTPS removes the phosphate groups of 7,8-dihydroneopterin triphosphate leading to 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin. Subsequently 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin is activated by HPPK to form 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate [16], which serves as substrate for the enzyme DHPS. This enzyme catalyses the conversion of the 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate and *p*-aminobenzoate to 7,8 dihydropteroate (FIGURE 1). The catalysis of the DHPS represents an attractive drug target and is already exploited by sulfa drugs, for example, the sulfonamides (sulfadoxine; FIGURE 2) and sulfones [17]. Afterwards 7,8-dihydropteroate is converted to 7,8-dihydrofolate in the presence of glutamate by DHFS [12].

The malaria pathogen can also import folate from its host and the salvaged folate is introduced into the parasite's metabolism. Briefly, the *de novo*-synthesized as well as the salvaged 7,8-dihydrofolate is reduced by the DHFR to 5,6,7,8-tetrahydrofolate within the thymidylate cycle (FIGURE 1). The plasmodial DHFR is known to be highly susceptible to already approved chemotherapeutics, such as pyrimethamine or cycloguanil (FIGURE 2) [18]. Although the human host also possesses a DHFR the susceptibility of the malaria enzyme to the DHFR inhibitor pyrimethamine (FIGURE 2) is much higher than of the human homolog [12]. The reduced folate is methylated by SHMT using serine as a methyl donor and thereby 5,10-methylenetetrahydrofolate is generated. Within the last step, dUMP is converted to dTMP, a reaction catalyzed by the TS using 5,10-methylenetetrahydrofolate as the substrate and thereby regenerating 7,8-dihydrofolate. In the malaria parasite, the TS occurs as a bifunctional enzyme together with the DHFR.

In order to avoid the dissemination of drug resistance and to increase efficacy, multidrug

treatment combining sulfa drugs with pyrimethamine (fansidar) is used [10]. However, it is already known that this combinatorial treatment is failing since drug-resistant strains are also appearing [19].

Thiamine biosynthetic pathway

■ Prodrug channeling will poison thiamine-dependent enzymes

Thiamine as well as its phosphorylated derivatives, thiamine monophosphate (TMP), thiamine pyrophosphate (TPP) and thiamine triphosphate are found in nature [20]. In contrast to TPP, thiamine triphosphate has yet not been detected in the malaria parasite. In mammals, it has been suggested that thiamine triphosphate plays a neurophysiological role, however, the precise function is currently not known [21]. TPP is the active form of the thiamine family and acts as a cofactor of a variety of enzymes, which includes the pyruvate dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenase, branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase or transketolase [22]. Humans and others mammals depend entirely on the import of this cofactor from their diet [23]. Deficiencies in the uptake or the absence of thiamine lead to Wernicke's disease and beriberi [23,24]. In contrast to mammals, plants, bacteria and fungi are able to synthesize thiamine *de novo* [25,26], and recent analysis revealed that the human malaria parasite is also capable of synthesizing B1 vitamers [27], however, the parasite is dependent on precursors fueling the biosynthetic pathway [27,28].

In *P. falciparum* the biosynthesis is divided into two pathways leading to TMP. While one pathway is responsible for the synthesis of the thiazole moiety, the other creates the pyrimidine moiety. The metabolism of the pyrimidines starts with the uptake of the 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (HMP), which is subsequently phosphorylated to HMP-P and further to HMP-PP by the catalysis of ThiD in two consecutive steps [29,30]. It is known that HMP derives in bacteria via the catalysis of ThiC from the purine biosynthesis [31], however in yeast Thi5-p merges pyridoxine 5-phosphate with histidine to synthesis HMP-P [32,33]. Although the malaria parasite also possesses a biosynthetic pathway for vitamin B6 – as outlined below – the respective enzyme encoding for Thi5-p was not found in the genome database of *P. falciparum* to connect both vitamin biosynthetic pathways [12]. In agreement with the bioinformatic analysis of the plasmodial genome

Figure 1. Folate biosynthetic pathway followed by the thymidylate cycle in *Plasmodium falciparum*. Inhibitors of the DHPS and the DHFR are indicated in bold.

Figure 2. Inhibitors interfering with the vitamin B9-, the vitamin B6- or the vitamin B1-metabolism in the malaria parasite.

database, cell culture experiments revealed that the provision of HMP is required for the growth of *P. falciparum* if an alternative thiamine source is omitted [27].

The other branch of the vitamin B1 biosynthetic pathway is responsible for the activation of the thiazole moiety by phosphorylation of 5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazole (THZ) to THZ-P, a catalysis carried out by ThiM [12,27]. Subsequently, both pathways are combined via the reaction of ThiE leading to TMP [34]. However, TMP is not the active form of the B1 vitamer and has to be phosphorylated to TPP, which can be carried out by the bacterial ThiL [27]. Alternatively TMP is dephosphorylated to thiamine and afterwards pyrophosphorylated by the TPK to obtain TPP. The latter synthesis of TPP is present in the malaria parasite [35]. Biochemical analysis revealed that the plasmodial TPK accepts only thiamine as a substrate and not its phosphorylated counterparts [35]. In *P. falciparum* the dephosphorylation step of TMP is catalyzed by a phosphatase that has broad substrate specificity [36]. In the past, initial approaches have been already undertaken to

exploit the catalytic properties of the plasmodial TPK by using a thiamine analogue, pyrithiamine [27]. While this compound is accepted as substrate by the plasmodial enzyme, pyrithiamine (**FIGURES 2 & 3**) revealed only a poor effect in *P. falciparum* cell culture [ESCHBACH MI, WRENGER C, PERS. COMM.]. However, even if pyrithiamine would potentially interfere with the proliferation of the human parasite it would be still questionable whether the molecule would harm host cells, since the TPK is also present in humans. In this context further experiments are required to evaluate the efficacy of pyrithiamine as an antimalarial.

In contrast to the TPK the malaria parasite possesses also the thiamine biosynthetic pathway, which offers the possibility to channel toxic metabolites into the parasite specific pathway (**FIGURE 3**). This strategy will generate an inactive cofactor that mimics TPP within the active site of thiamine-dependent enzymes and will not sustain the enzymatic activity of the respective B1-dependent enzyme. In bacteria, the naturally occurring HMP analogue bacimethrin (MeO-HMP; **FIGURE 2**) has already been successfully applied in the selection processes of bacteria [37]. Thereby, MeO-HMP is introduced into the thiamine biosynthesis pathway via the pyrimidine branch of the malaria parasite. Despite the fact that MeO-HMP was successfully tested as a substrate of the recombinantly expressed plasmodial ThiD and ThiE proteins (**FIGURE 3**), MeO-HMP did not affect the growth of the parasite, possibly due to limitations in their uptake [27]. However, although this attempt did not lead to an inhibition of the parasites' proliferation, the opportunity to channel metabolic precursors into the metabolism of the parasite should be propagated with chemically improved HMP derivatives and even further in future studies extended to the thiazole branch. Prodrugs that are accepted by ThiM as substrate can, therefore, be phosphorylated and, subsequently, directed towards the synthesis of an inactive cofactor, which will then block the enzymatic activity of TPP-dependent proteins.

These prodrugs are of general interest for the treatment of pathogens that proliferate in host organisms that do not possess this (thiamine) biosynthetic pathway, since the prodrug is ideally designed to selectively interfere with the pathogen without affecting the host. However, applying this strategy the uptake capabilities of prodrugs as well as the possible salvage of the

Figure 3. Proposed channeling of prodrugs into the thiamine pool via the thiamine *de novo* synthesis in *Plasmodium falciparum*. The biosynthetic pathway of vitamin B1 is divided into two branches, the thiazole branch, consisting of the enzyme ThiM, and the pyrimidine branch, which is mediated by ThiD. Afterwards, both branches are merged by ThiE to yield thiamine monophosphate. Thiamine monophosphate is dephosphorylated by a Phos and subsequently pyrophosphorylated by TPK leading to the active cofactor [36,46]. The plasmodial ThiD accepts bacimethrin as a substrate [28]. Pyrithiamine is a substrate of the plasmodial TPK leading to pyrithiamine pyrophosphate [36].

vitamin, which would compete with the *de novo* synthesis, have to be taken into account.

Vitamin B6 metabolism in

P. falciparum

■ Vitamin B6 biosynthesis & its interconversion are proposed to be suitable for drug & prodrug discovery

Vitamin B6 consists of three different B6 vitamers: pyridoxine, pyridoxal and pyridoxamine, and their respective phosphorylated forms. The active form of the cofactor is pyridoxal 5-phosphate (PLP), which is involved in more than 100 distinct enzymatic reactions.

The cofactor is mainly required for decarboxylation and transamination processes within the amino acid metabolism [38]. Consistent with the quantity of different roles in metabolic processes PLP-dependent enzymes have already been subject to drug-discovery approaches [39,40]. Mammals are unable to

synthesize vitamin B6 *de novo* and therefore, they entirely depend on the uptake. In contrast, almost all bacteria, fungi and plants possess a vitamin B6 biosynthetic pathway. So far, two different pathways of the *de novo* biosynthesis are known, the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DOXP)-dependent and the DOXP-independent pathway. The DOXP-dependent biosynthesis is present in some bacteria, such as *Escherichia coli* and leads to pyridoxine 5-phosphate [41–43], which has to be subsequently oxidized to the active form, PLP, by PdxH [41]. In contrast to the DOXP-dependent pathway, the DOXP-independent synthesis leads to the active cofactor PLP, which could be demonstrated by performing an activity assay with the plasmodial ODC, a key enzyme within the polyamine metabolism catalyzing the conversion of ornithine to putrescine [44], as a member of the PLP-dependent enzyme family (FIGURE 4) [45]. This biosynthetic pathway has been identified

Figure 4. Vitamin B6 biosynthesis and interconversion pathways in *Plasmodium falciparum*.

The biosynthesis pathway of vitamin B6 is consisting of Pdx1 and Pdx2 leading to the active cofactor pyridoxal 5-phosphate. The plasmodial Pdx1 enzyme is inhibited by 4PEHz [66]. Within the interconversion pathway pyridoxal can be phosphorylated by the PdxK and dephosphorylated by Phos [37,59]. The prodrugs PT3 (and also PT5) can be taken up and activated to PT3-P (and also PT5-P) by the PdxK [67]. These inactive cofactors are subsequently able to poison PLP-dependent enzymes, such as the plasmodial ODC, a key enzyme in the essential polyamine metabolism, by inhibiting the catalysis from ornithine to putrescine [67].

in plants, fungi and some bacteria, which has originally been proposed to participate in the defense against oxidative stress [46–51]. During synthesis, the enzymes Pdx1 (also named SNZ1 in yeast) and Pdx2 (SNO1 in yeast) use ribose 5-phosphate, glyceraldehyde 3-phosphate and glutamine as substrates (**FIGURE 4**) [51,52]. In the presence of Pdx1, Pdx2 is deaminating glutamine to glutamate and the liberated ammonia is shuttled via a putative ammonia tunnel to the active site of the Pdx1 enzyme [53], where it is needed to form PLP (**FIGURE 4**). Structural analysis of both proteins revealed that they are forming a multimeric protein complex, the PLP synthase, consisting of 12 Pdx1 proteins individually attached to 12 Pdx2 proteins [53–56]. In the past by performing labeling experiments, the presence of a vitamin B6 metabolite in *P. falciparum* had been suggested [57]. In subsequent analyses the participating enzymes have been identified, biochemically characterized and thereby assigned to the DOXP-independent pathway [58,59]. Furthermore, the DOXP-independent vitamin B6 biosynthesis is not restricted to the malaria parasite because its presence has also been demonstrated in the related apicomplexan parasite *T. gondii* [45,58]. In contrast to *Plasmodium* and *Toxoplasma* analyses of the genome databases of *Eimeria* and *Cryptosporidia* or of the other protozoan pathogens *Trypanosoma* and *Leishmania* did not reveal homologue counterparts of Pdx1 and Pdx2, which emphasizes that the vitamin B6 biosynthesis is not abundant in protozoan parasites. However, recently, advantage has already been taken of the presence of the vitamin B6 biosynthetic pathway by exploiting the dual function of PLP. As outlined above, PLP is on the one hand a cofactor necessary for enzymatic catalysis of PLP-dependent enzymes, but PLP exhibits also another function: the malaria parasite invades and proliferates in human host cells and is thereby permanently exposed to reactive oxygen species, which causes oxidative stress [30]. Elevated levels of oxidative stress results from the immune response of the respective host, where reactive oxygen species are used to combat invading pathogens and from its own metabolism, the digestion of human hemoglobin in the erythrocytic phase of the life cycle. During hemoglobin catabolism a number of different reactive oxygen species are generated, which includes H_2O_2 , hydroxyl- and superoxide-radicals as well as highly reactive singlet oxygen (1O_2) molecules [60]. These molecules

have to be detoxified. While the parasite possesses a variety of anti-oxidative defense mechanisms [9,60–63], none of them addresses singlet oxygen. Recently it was demonstrated that PLP is involved in the protection against 1O_2 in *P. falciparum* [58,64], which has been attributed to the catalysis of the plasmodial PLP synthase complex as validated by protein interference experiments using transgenically modified parasites [64]. This dual function of PLP underlines that the vitamin B6 biosynthesis in *P. falciparum* is highly druggable, which, indeed, has already been exploited (**FIGURE 4**). Using rational drug design by *in silico* docking of potential inhibitors into the active site of the plasmodial Pdx1 protein, molecules that inhibited the catalysis of the recombinant enzyme were discovered [65]. The deriving lead compound 4-phospho-D-erythronhydrazide (4PEHz; **FIGURE 2**) was subsequently tested at the cellular level revealing an IC_{50} value of 10 μ M. Furthermore, the mode of action had also been analyzed using a *P. falciparum* PLP synthase-overexpressing cell line, which became more resistant to the administration of 4PEHz in comparison with the respective mock-control cell line [65]. These results clearly validate the plasmodial vitamin B6 biosynthetic pathway as druggable even though the potency of the current lead compound needs to be improved.

Although the malaria parasite has a vitamin B6 biosynthetic pathway and would, therefore, not be dependent on external sources, *P. falciparum* additionally holds an interconversion pathway of B6 vitamers, which consists of the PdxK (**FIGURE 4**) [58,66]. The need for this pathway has yet not been demonstrated and it is not clear whether the malaria parasite is using the catalysis of PdxK for the phosphorylation of eventually imported B6 vitamers (up to now, the uptake capabilities have not been confirmed) or for the salvage of the parasite-derived PLP upon dephosphorylation. Moreover, a high quantity of PLP is bound to serum albumin and hemoglobin [24] and thereby less accessible to the parasite. However, recombinantly expressed PdxK accepts all three nonphosphorylated forms of vitamin B6 as substrate [58] and its catalytic properties were already subject to prodrug discovery in which nontoxic precursors are modified by the plasmodial enzyme to their toxic forms [66]. The two vitamin B6 amino acid chimeras PT3 and PT5 (pyridoxyl-tryptophan methyl esters; **FIGURE 2**) were found to be converted to their

respective phosphorylated forms by the plasmodial PdxK. Furthermore, these forms were also able to inhibit the plasmodial ODC clearly indicating that PT3 and PT5 are serving as prodrugs with the capability to be channeled into vitamin B6 homeostasis, and, thereby, poison PLP-dependent enzymes (**FIGURE 4**) [12,66]. Applying these compounds on the cellular level revealed an antiproliferative effect which is approximately eight- to ten-fold less effective against human cells [66]. However, *in vivo* experiments are needed to gain information on organism level. Recently, a high-throughput screening approach against the *Trypanosoma brucei* ODC discovered a series of inhibitors that contain a similar structure moiety that is also found in PT3 [67]. Even further structurally related molecules to PT3 were also effective against tumor cell proliferation [39,40].

In order to evaluate the mode of action within the parasite a transgenic *P. falciparum* cell line, overexpressing the plasmodial PdxK, was generated. This cell line was subsequently more susceptible to the prodrugs than the mock-control cell line, which directly links the PdxK to the activation of the prodrugs. In summary, both the biosynthetic as well as the interconversion pathway of the vitamin B6 metabolism in *P. falciparum* demonstrate their excellent potential for the design of novel or chemically modified lead compounds to combat the crucial malaria parasite.

Conclusion

Targeting the vitamin metabolism of the parasite in terms of the salvage and biosynthesis pathways of folate already has a long-standing history. The ongoing drug resistance against antifolates has forced researchers to the use of combinational therapies. However, even against these therapeutic approaches drug resistance of the parasite is spreading. As summarized in this review the

thiamine and vitamin B6 metabolisms have high potential to serve as powerful drug targets and offer the opportunity to design prodrugs to be selectively channeled into the parasites vitamin metabolism. Lead compounds have already been discovered, validated at the enzymatic level and successfully applied in cell culture experiments.

Future perspective

The malaria parasite is characterized by a high mutational rate, which is, thereby, accompanied by a rapid development of resistance of the commonly used drugs. In the race against rapidly developing drug resistance there is an urgent need for novel chemotherapeutic targets. These drugs should be created to target only the parasite without, or with harmless, effects on the human host. Therefore, ideal drug targets exploit novelties that are different or even absent in the respective host metabolism. In this sense, the malaria-specific vitamin biosynthetic pathways harbor high potential for the discovery of novel antimalarials. In recent investigations the plasmodial thiamine and B6 biosynthetic pathways were analyzed for their druggability using lead molecules [27,65,66]. Although the efficacy still reveals limitations, the lead molecules clearly demonstrated their effectiveness especially against the plasmodial vitamin B6 metabolism and validated this pathway for being an excellent drug target [64,65]. In the upcoming years, by applying medical chemistry as well as industrialized high-throughput technologies, it is expected that these compounds are optimised and processed to novel chemotherapeutic agents which will selectively interfere with the thiamine or/and vitamin B6 biosynthetic pathways.

Acknowledgement

The authors would like to thank MR Groves (EMBL-Hamburg) for helpful comments and discussions.

Executive summary

- Malaria leads to severe health problems and is accompanied by a high rate of mortality. The most severe form of malaria, *Malaria tropica* is caused by the apicomplexan parasite *Plasmodium falciparum*.
- Various factors, including global climate changes, increasing migration patterns, failing health care systems, ongoing formation of drug resistance, are promoting the spread of the parasite.
- Novel drugs as well as drug targets are urgently needed, which are parasite specific and not harming to the human host. Potent vaccines are not available.
- Vitamin biosynthetic pathways are not present in humans whereas the malaria parasite possesses besides vitamin B9- (folate) also the B6- (pyridoxine) and B1- (thiamine) *de novo* synthesis pathways.
- Conversely, these pathways are suitable for inhibitor discovery but also highly attractive for the design of prodrugs, which are channeled via the parasite-specific biosynthetic pathway into their essential cofactor pool and thereby poisoning the respective dependent enzymes.

Financial & competing interests disclosure

Relevant work of the authors was supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) [grants WR 124/2 and WR124/3], the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grants 2009/54325-2, 2010/20647-0 and

2011/13706-3]. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

Papers of special note have been highlighted as:

■ of interest

■ of considerable interest

- Burrows JN. Antimalarial drug discovery: where next? *Future Med. Chem.* 4(18), 2233–2235
- World Health Organisation. World Malaria Report 2011. WHO Press, Geneva, Switzerland (2012).
- Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern? *Braz. J. Infect. Dis.* 14(3), 299–309 (2010).
- Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE *et al.* Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest.* 118(4), 1266–1276 (2008).
- General overview regarding malaria.**
- Mahajan SS, Gut J, Rosenthal PJ, Renslo AR. Ferrous iron-dependent delivery of therapeutic agents to the malaria parasite. *Future Med. Chem.* 4(18), 2241–2249 (2012).
- Bhattarai A, Ali AS, Kachur SP *et al.* Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. *PLoS Med.* 4(11), e309 (2007).
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P *et al.* Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* 361(5), 455–467 (2009).
- Müller IB, Hyde JE. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. *Future Microbiol.* 5(12), 1857–1873 (2010).
- Nzila A, Ward SA, Marsh K, Sims PF, Hyde JE. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part I): pointers for malaria treatment from cancer chemotherapy. *Trends Parasitol.* 21(6), 292–298 (2005).
- Hyde JE. Drug-resistant malaria. *Trends Parasitol.* 21(11), 494–498 (2005).
- Hyde JE. Drug-resistant malaria – an insight. *FEBS J.* 274(18), 4688–4698 (2007).
- Müller IB, Hyde JE, Wrenger C. Vitamin B metabolism in *Plasmodium falciparum* as a source of drug targets. *Trends Parasitol.* 26(1), 35–43 (2010).
- Schellenberg KA, Coatney GR. The influence of antimalarial drugs on nucleic acid synthesis in *Plasmodium gallinaceum* and *Plasmodium berghei*. *Biochem. Pharmacol.* 6, 143–152 (1961).
- Salcedo-Sora JE, Ochong E, Beveridge S *et al.* The molecular basis of folate salvage in *Plasmodium falciparum*: characterization of two folate transporters. *J. Biol. Chem.* 286(52), 44659–44668 (2011).
- Nair S, Miller B, Barends M *et al.* Adaptive copy number evolution in malaria parasites. *PLoS Genet.* 4(10), e1000243 (2008).
- Dittrich S, Mitchell SL, Blagborough AM *et al.* An atypical orthologue of 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase can provide the missing link in the folate biosynthesis pathway of malaria parasites. *Mol. Microbiol.* 67(3), 609–618 (2008).
- Novel insights into the folate metabolism.**
- Olhio P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol. Ther.* 89(2), 207–219 (2001).
- Nduati E, Diriyee A, Ommeh S *et al.* Effect of folate derivatives on the activity of antifolate drugs used against malaria and cancer. *Parasitol. Res.* 102(6), 1227–1234 (2008).
- Bunnag D, Harinasuta T. Studies on the chemotherapy of human opisthorchiasis in Thailand: I. Clinical trial of praziquantel. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 11(4), 528–531 (1980).
- Mahan LC, Escott-Stump S, Raymond JL, Krause MV. *Krause's Food & the Nutrition Care Process*. Saunders Elsevier, MO, USA (2012).
- Makarchikov AF, Lakaye B, Gulyai IE *et al.* Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals. *Cell Mol. Life Sci.* 60(7), 1477–1488 (2003).
- Pohl M, Sprenger GA, Muller M. A new perspective on thiamine catalysis. *Curr Opin. Biotechnol.* 15(4), 335–342 (2004).
- Haas RH. Thiamine and the brain. *Annu. Rev. Nutr.* 8, 483–515 (1988).
- Friedrich W. *Vitamins*. Walter de Gruyter, Berlin, Germany (1988).
- Begley TP, Downs DM, Ealick SE *et al.* Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol.* 171(5), 293–300 (1999).
- Wightman R, Meacock PA. The THI5 gene family of *Saccharomyces cerevisiae*: distribution of homologues among the hemiascomycetes and functional redundancy in the aerobic biosynthesis of thiamin from pyridoxine. *Microbiology* 149(Pt 6), 1447–1460 (2003).
- Wrenger C, Eschbach ML, Müller IB, Laun NP, Begley TP, Walter RD. Vitamin B1 *de novo* synthesis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* depends on external provision of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine. *Biol. Chem.* 387(1), 41–51 (2006).
- Divo AA, Geary TG, Davis NL, Jensen JB. Nutritional requirements of *Plasmodium falciparum* in culture. I. Exogenously supplied dialyzable components necessary for continuous growth. *J. Protozool.* 32(1), 59–64 (1985).
- Reddick JJ, Kinsland C, Nicewonger R *et al.* Overexpression, purification and characterization of two pyrimidine kinases involved in the biosynthesis of thiamin: 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine kinase and 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate kinase. *Tetrahedron* 54(52), 159873–15991 (1998).
- Müller S, Kappes B. Vitamin and cofactor biosynthesis pathways in *Plasmodium* and other apicomplexan parasites. *Trends Parasitol.* 23(3), 112–121 (2007).
- Zhang Y, Taylor SV, Chiu HJ, Begley TP. Characterization of the *Bacillus subtilis* ThiC operon involved in thiamine biosynthesis. *J. Bacteriol.* 179(9), 3030–3035 (1997).
- Hohmann S, Meacock PA. Thiamin metabolism and thiamine diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1385(2), 201–219 (1998).
- Morett E, Korbel JO, Rajan E *et al.* Systematic discovery of analogous enzymes

- in thiamin biosynthesis. *Nat. Biotechnol.* 21(7), 790–795 (2003).
- 34 Peapus DH, Chiu HJ, Campobasso N, Reddick JJ, Begley TP, Ealick SE. Structural characterization of the enzyme-substrate, enzyme-intermediate, and enzyme-product complexes of thiamin phosphate synthase. *Biochemistry* 40(34), 10103–10114 (2001).
- 35 Eschbach ML, Müller IB, Gilberger TW, Walter RD, Wrenger C. The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* expresses an atypical N-terminally extended pyrophosphokinase with specificity for thiamine. *Biol. Chem.* 387(12), 1583–1591 (2006).
- 36 Knöckel J, Bergmann B, Müller IB, Rathaur S, Walter RD, Wrenger C. Filling the gap of intracellular dephosphorylation in the *Plasmodium falciparum* vitamin B1 biosynthesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157(2), 241–243 (2008).
- 37 Lawhorn BG, Gerdes SY, Begley TP. A genetic screen for the identification of thiamin metabolic genes. *J. Biol. Chem.* 279(42), 43555–43559 (2004).
- 38 Percudani R, Peracchi A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep.* 4(9), 850–854 (2003).
- 39 Wu F, Christen P, Gehring H. A novel approach to inhibit intracellular vitamin B6-dependent enzymes: proof of principle with human and plasmodium ornithine decarboxylase and human histidine decarboxylase. *FASEB J.* 25(7), 2109–2122 (2011).
- 40 Wu F, Gehring H. Structural requirements for novel coenzyme-substrate derivatives to inhibit intracellular ornithine decarboxylase and cell proliferation. *FASEB J.* 23(2), 565–574 (2009).
- 41 Fitzpatrick TB, Amrhein N, Kappes B, Macheroux P, Tews I, Raschle T. Two independent routes of *de novo* vitamin B6 biosynthesis: not that different after all. *Biochem. J.* 407(1), 1–13 (2007).
- 42 Roa BB, Connolly DM, Winkler ME. Overlap between *pdxA* and *ksgA* in the complex *pdxA-ksgA-apaG-apaH* operon of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 171(9), 4767–4777 (1989).
- 43 Lam HM, Tancula E, Dempsey WB, Winkler ME. Suppression of insertions in the complex *pdxJ* operon of *Escherichia coli* K-12 by *lon* and other mutations. *J. Bacteriol.* 174(5), 1554–1567 (1992).
- 44 Müller IB, Das Gupta R, Lüersen K, Wrenger C, Walter RD. Assessing the polyamine metabolism of *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160(1), 1–7 (2008).
- 45 Knöckel J, Müller IB, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C. The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* generates pyridoxal phosphate *de novo*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 152(1), 108–111 (2007).
- 46 Padilla PA, Fuge EK, Crawford ME, Errett A, Werner-Washburne M. The highly conserved, coregulated SNO and SNZ gene families in *Saccharomyces cerevisiae* respond to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* 180(21), 5718–5726 (1998).
- 47 Osmani AH, May GS, Osmani SA. The extremely conserved *pyrA* gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J. Biol. Chem.* 274(33), 23565–23569 (1999).
- 48 Ehrenshaft M, Jenns AE, Chung KR, Daub ME. *SOR1*, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora* fungi, is highly conserved in divergent organisms. *Mol. Cell* 1(4), 603–609 (1998).
- 49 Ehrenshaft M, Bilski P, Li MY, Chignell CF, Daub ME. A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B6 biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96(16), 9374–9378 (1999).
- 50 Belitsky BR. Physical and enzymological interaction of *Bacillus subtilis* proteins required for *de novo* pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 186(4), 1191–1196 (2004).
- 51 Raschle T, Amrhein N, Fitzpatrick TB. On the two components of pyridoxal 5'-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 280(37), 32291–32300 (2005).
- 52 Burns KE, Xiang Y, Kinsland CL, McLafferty FW, Begley TP. Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 127(11), 3682–3683 (2005).
- 53 Strohmeier M, Raschle T, Mazurkiewicz J *et al.* Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103(51), 19284–19289 (2006).
- **First crystal structure of the pyridoxal 5-phosphate synthase.**
- 54 Bauer JA, Bennett EM, Begley TP, Ealick SE. Three-dimensional structure of YaaE from *Bacillus subtilis*, a glutaminase implicated in pyridoxal-5'-phosphate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279(4), 2704–2711 (2004).
- 55 Zhu J, Burgner JW, Harms E, Belitsky BR, Smith JL. A new arrangement of (beta/alpha)8 barrels in the synthase subunit of PLP synthase. *J. Biol. Chem.* 280(30), 27914–27923 (2005).
- 56 Zein F, Zhang Y, Kang YN, Burns K, Begley TP, Ealick SE. Structural insights into the mechanism of the PLP synthase holoenzyme from *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 45(49), 14609–14620 (2006).
- 57 Cassera MB, Gozzo Fc, D'alexandri Fl *et al.* The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 279(50), 51749–51759 (2004).
- **First proof of the presence of the vitamin B6 biosynthesis in *Plasmodium falciparum*.**
- 58 Wrenger C, Eschbach ML, Müller IB, Warnecke D, Walter RD. Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 280(7), 5242–5248 (2005).
- **First indication of the dual role of vitamin B6 – cofactor and oxidative stress mediator in malaria.**
- 59 Gengenbacher M, Fitzpatrick TB, Raschle T *et al.* Vitamin B6 biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights. *J. Biol. Chem.* 281(6), 3633–3641 (2006).
- 60 Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* 34(2), 163–189 (2004).
- **Comprehensive overview of oxidative stress in *Plasmodium*.**
- 61 Müller S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 53(5), 1291–1305 (2004).
- **Detailed illustration of the present antioxidant systems in malaria.**
- 62 Müller S, Gilberger TW, Krnaiski Z, Luersen K, Meierjohann S, Walter RD. Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protoplasma* 217(1–3), 43–49 (2001).
- 63 Rahlfs S, Schirmer RH, Becker K. The thioredoxin system of *Plasmodium falciparum* and other parasites. *Cell Mol. Life Sci.* 59(6), 1024–1041 (2002).
- 64 Knöckel J, Müller IB, Butzloff S, Bergmann B, Walter RD, Wrenger C. The antioxidative effect of *de novo* generated vitamin B6 in *Plasmodium falciparum* validated by protein interference. *Biochem. J.* 443(2), 397–405 (2012).
- 65 Reeksting SB, Müller IB, Burger PB *et al.* Exploring inhibition of Pdx1, a component

- of the PLP synthase complex of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* 449(1), 175–187 (2013).
- 66 Müller IB, Wu F, Bergmann B *et al.* Poisoning pyridoxal 5-phosphate-dependent enzymes: a new strategy to target the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE* 4(2), e4406 (2009).
- ■ **First use of prodrugs on the vitamin B6 metabolism in *Plasmodium*.**
- 67 Smithson DC, Lee J, Shelat AA, Phillips MA, Guy RK. Discovery of potent and selective inhibitors of *Trypanosoma brucei* ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 285(22), 16771–16781 (2008).

APÊNDICE C – Vitamin B6-dependent enzymes in the human malaria parasite
Plasmodium falciparum - a druggable target?

Vitamin B6-dependent enzymes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* - a druggable target?

Thales Kronenberger^{*,a}, Jasmin Lindner^{*,+,a}, Kamila A. Meissner^{*,++,a}, Flávia M. Zimbres^{*,a}, Frank M. Sauer^{a,#}, Isolmar Schettert^b and Carsten Wrenger^{a,**}

^aUnit for Drug Discovery, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-000 São Paulo-SP, Brazil

^bLaboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute InCor, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 44, 05403-000 São Paulo-SP, Brazil

* These authors contributed equally to this work

**To whom correspondence should be addressed: Phone: +55 11 3091 7335, Fax: +55 11 3091 7417, Email: cwrenger@icb.usp.br

⁺A portion of this work was conducted in partial fulfilment of the requirement for a Ph.D. from the University of Hamburg.

⁺⁺A portion of this work was conducted in partial fulfilment of the requirement for a Ph.D. from the Westfälische Wilhelms-University Münster

[#]A portion of this work was conducted within the Master thesis at the Westfälische Wilhelms-University Münster

Key words: vitamin B6, pyridoxal 5-phosphate, polyamines, ornithine decarboxylase (ODC), aspartate aminotransferase (AspAT), serine hydroxymethyltransferase (SHMT)

Abstract

Malaria is a deadly infectious disease which affects millions of people each year in tropical regions. There is no effective vaccine available and the treatment is based on drugs which are currently facing an emergence of drug-resistance and in this sense the search for new drug-targets is indispensable. It is well established that vitamin biosynthetic pathways like the vitamin B6 *de novo* synthesis present in *Plasmodium* are excellent drug-targets, however the active form of vitamin B6, pyridoxal 5-phosphate, is besides its anti-oxidative properties, a cofactor for a variety of essential enzymes present in the malaria parasite which includes the ornithine decarboxylase (synthesis of polyamines), the aspartate aminotransferase (involved in the protein biosynthesis) as well as the serine hydroxymethyltransferase (a key enzyme within the folate pathway and also in the DNA synthesis).

Introduction

Malaria is a devastating infectious disease, which causes serious problems in tropical and subtropical areas. According to the World Health Organization (WHO) the population of more than 100 countries is exposed to malaria parasites [1]. The causative agent of malaria is belonging to the genus *Plasmodium*, which can affect almost all vertebrates, however only five species have been reported to be infective for humans, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* and *P. knowlesi* [2]. The transmission of the parasite occurs through a blood meal of the *Anopheles* vector. Thereby sporozoites are transmitted to the vertebrate host and the comprehensive life cycle of the pathogen is initiated [3]. In the past, several attempts to control the disease have been undertaken to exterminate the vector with insecticide. However, due to spreading drug resistance these insecticides lost their efficacy [4]. A similar situation is present for the treatment of patients, since an effective vaccine is not yet available and the medication of malaria is solely drug based [5, 6].

The folate (vitamin B9) metabolism is a validated drug-target in several infectious diseases and its biosynthesis is not present in humans. Folate is an essential cofactor in enzymatic reactions transferring one-carbon (C1)-groups [7, 8] and prominent drugs such as pyrimethamine and cycloguanil as inhibitors of the dihydrofolate reductase and the sulfa drugs against the dihydropteroate synthase are well characterised [7, 8]. However resistance is rising - among others – also against this metabolic pathway. Currently there is a move towards artemisinin-based combination therapies (ACTs) [9, 10]. As already indicated above due to the fact that currently no effective vaccines are available and the parasite's speed in

developing resistance against almost all chemotherapeutic compounds is alarming, there is an urgent need to discover new drug-targets, which are subsequently exploitable for the design of new antimalarials [11, 12]. In the search for novel antimalarials, attention has been drawn on selective interference with the parasite's metabolism, without harming the human host [13]. In this sense promising drug targets are the vitamin biosyntheses.

Vitamins are molecules which have a variety of functions in nature. They act as antioxidants, as precursors in electron carrying processes or are involved in enzymatic reactions by acting as cofactors in metabolic pathways such as the vitamins of the B-family [14]. Mammals generally depend on the uptake of vitamins, unlike other groups, such as bacteria, plants and fungi which can synthesize them *de novo*. Some apicomplexan parasites possess also vitamin biosynthetic pathways which represent attractive drug targets to interfere with [7, 13].

So far, three vitamin biosynthetic pathways have been identified and characterised in malaria parasites [7, 13]. Besides the occurrence of the folate- (vitamin B9) and the thiamine- (vitamin B1) biosyntheses, *Plasmodium* possesses also a vitamin B6 biosynthetic pathway. Vitamin B6 is designated for six vitamers: pyridoxine (PN), pyridoxamine (PM), pyridoxal (PL) and their respective phosphorylated forms. Besides their phosphorylation they differentiate in their substitutions at the 4th position of the pyridine ring (Figure 1). However pyridoxal 5-phosphate (PLP) is the only active form of the enzymatic cofactor which is mainly involved in decarboxylation and transamination reactions [15].

Up to now, two different vitamin B6 biosynthesis pathways are described: (i)

The 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DOXP)-dependent pathway is found in some proteobacteria and is leading to pyridoxine 5-phosphate [16-18]. (ii) The second pathway, the DOXP-independent pathway, is found in plants, fungi and the apicomplexan parasites *Plasmodium* and *Toxoplasma gondii* [19-21].

Historically the DOXP-independent pathway was identified in plants and ascribed to oxidative stress response [22, 23]. Afterwards the analysis of this pathway discovered the biosynthesis of PLP, which is mediated by an enzyme complex (PLP-synthase) composed of a core of 12 Pdx1 (also known as SNZ1 in yeast) individually surrounded by 12 Pdx2 (called SNO1 in yeast) [24, 25]. The reaction mechanism has already been studied in some detail, starting with the deamination of glutamine to glutamate which is catalysed by Pdx2, subsequently the ammonia group is channelled to Pdx1, where it is combined with the two others substrates, ribose 5-phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate, leading to the active cofactor [24, 26]. This complex has already been tested for its druggability by performing *in silico* screens in order to dock compounds into the active site. Identified compounds were further employed in *in vitro* assays using recombinantly expressed enzymes. The best compound derived from this screen was the 4-phospho-D-erythrionhydrazide, which revealed an IC₅₀-value of 10 µM in cell culture experiments [27].

Moreover, besides the well-established function of vitamin B6 in acting as a cofactor the molecule is also involved in the combat against reactive oxygen species (ROS), in particular against singlet oxygen [22, 28]. This “second” mode of action is especially of relevance for the intra-erythrocytic stage of the human malaria parasite, since during proliferation within the

erythrocytes, *Plasmodium* is permanently exposed to ROS due to the oxidative environment of its host cell which is accompanied by the parasite driven haemoglobin degradation [29, 30].

Additionally, the parasite’s genome encodes also for an interconversion pathway which consists of the pyridoxal kinase (PdxK) and a phosphatase [7] [4]. The latter reveals a broad substrate spectrum and therefore it is questionable whether this enzyme is solely responsible for the dephosphorylation of B6 vitamers [20, 31]. The PdxK catalyses the phosphorylation of pyridoxal, but also accepts the other B6 vitamers as substrate [20, 32]. The presence of both - biosynthetic and interconversion - pathways remains still for elucidation since the parasite is able to generate PLP via two pathways which would obviously emphasise an uptake of B6 vitamers [4].

In *P. falciparum*, the PdxK enzyme was already exploited to channel pro-drugs into the parasite’s metabolism by mimicking its native substrate. Pyridoxal-tryptophan chimeras were converted into their respective phosphorylated forms by PdxK. Subsequently, these molecules were shown to interfere with PLP-dependent enzymes by inhibiting their catalyses and hence growth of the parasite [32].

PLP-dependent enzymes

PLP-dependent enzymes are characterised by their broad range of enzymatic activities and their participations in different metabolic pathways [15, 33]. Besides the glycogen phosphorylases, which follow a different mechanism [34, 35], PLP-dependent enzymes are mainly concentrated within the amino-acid metabolism [36]. During catalysis of the PLP-dependent enzyme PLP binds covalently to the respective substrate by

acting as an electrophilic stabilizer of the carbanion intermediate [37]. In the past few attempts have been undertaken to classify PLP-dependent enzymes according to their activities and evolutionary history by splitting them into four major classes [38, 39]. Due to their conservation in the nature, it has been suggested that PLP-dependent enzymes derived from a common ancestor before division into the three kingdoms of life occurred [38].

Afterwards, this classification was refined by analysing genomic and structural information [15, 40] which led to the sorting of PLP-dependent enzymes into seven groups (Table 1).

Kappes and collaborators suggested that, because of the existing metabolic diversity, PLP-dependent enzymes within protozoan parasites would have potential to be good drug targets [41]. Most of the enzymes found belong to the group I, at least 2/3, followed by the less expressive group II, while the groups IV and V are rare and the groups VI and VII almost inexistent. Recent genome database analysis of parasites identified a minimal set of enzymes that are highly abundant which includes the serine hydroxymethyltransferase (SHMT), the aspartate aminotransferase (AspAT), the alanine transaminase, the branched-chain-amino-acid transaminase and the cysteine desulfurase [41]

Moreover, the comparison of all available genomes of free-living organisms revealed that only two EC-classified enzymes are always present: The AspAT (EC 2.6.1.1) and the SHMT (EC 2.1.2.1), which underlines the fundamental importance of these enzymes [15].

Additionally several others PLP-dependent enzymes have already been exploited as drug targets such as the γ -aminobutyric acid GABA aminotransferase by the drug vigabatrin

for treatment of epilepsy [42], the alanine racemase in microbicides [43] or the ornithine decarboxylase (ODC) in cancer research [44]. In particular the ODC was also subject to drug discovery approaches against protozoan parasites, but not limited as outlined below for the aspartate aminotransferase (AspAT) and the serine hydroxymethyltransferase (SHMT). However the occurrence of PLP-dependent enzymes in the malaria parasite is not restricted to these three proteins as shown in Table 2.

Ornithine Decarboxylase (ODC)

As already outlined above, vitamin B6-dependent enzymes play central roles in the metabolism of amino acids, but also in the polyamine synthesis. Polyamines are simply structured aliphatic nitrogenous bases containing an essential role in cell growth, proliferation and differentiation due to their stabilizing effect on macromolecules such as nucleic acids, proteins and lipids. Their function is considered to be based on reversible ionic interactions with the negatively charged macromolecules [45-47].

The ornithine decarboxylase (ODC) is a PLP-dependent enzyme which acts as a key regulator in the polyamine biosynthesis by decarboxylating ornithine to the polyamine putrescine – the first step in this synthesis. In contrast to ornithine, the other precursor of the polyamine synthesis, *S*-adenosylmethionine (AdoMet), is synthesized from methionine and ATP by the enzyme AdoMet synthase. AdoMet is also used to generate the polyamines spermidine and spermine. *P. falciparum* possesses a unique polyamine biosynthesis due to the bifunctional appearance of its key enzymes, *S*-adenosylmethionine decarboxylase (AdoMetDC) and ornithine decarboxylase (ODC). Thereby, both enzymes appear as the bifunctional AdoMetDC/ODC whose

organisation was discussed as an advantage in substrate channelling [48]. There are more bifunctional proteins known in *P. falciparum* such as the dihydrofolate reductase - thymidylate synthase (DHFR-TS) that is also present in other protozoa [49, 50], the dihydropteroate synthetase/dihydrohydroxymethylpterin pyrophosphokinase (DHPSP-PPK) [51], the glucose-6-phosphate dehydrogenase/6-phosphogluconolactonase [52] and the guanylate cyclase/adenylate cyclase [53].

Among others, this unique organisation of the *Pf*ODC has been discussed to be an attractive drug target [54]. As the amino acid sequence of *Pf*ODC shares 38,7 % identity to the human homologue, complications in rational drug design of *Pf*ODC-specific lead compounds could be a crucial issue [55]. Generally, there are three different strategies of inhibitor design. A formerly used strategy for designing inhibitors of vitamin B6-dependent enzymes is based on coenzyme-substrate-conjugates that - in their reduced form - cannot be processed by the enzyme [56].

Another - already validated - strategy is the use of substrate analogues in order to inhibit enzyme catalysis like the specific ODC inhibitor difluoromethylornithine (DFMO), originally designed as an anticancer agent. DFMO blocks the erythrocytic schizogony of *P. falciparum* in cell culture at the micro-molar level (Table 1) and reduces the parasitemia in *Plasmodium berghei*-infected mice [57-60]. DFMO, a derivative of the amino acid ornithine, inhibits the enzyme irreversibly by an alkylation of its active site. A combination of DFMO and bis(benzyl)polyamines revealed a curative effect in rodent malaria [61]. Moreover DFMO reveals a more prominent role due to its effectiveness

against *Trypanosoma brucei gambiense*, the agent of the West African Sleeping Sickness [62-64]. Only marginal effects of DFMO have been observed in the apicomplexan relatives of *P. falciparum*, *Cryptosporidia* sp. [65] and *Toxoplasma gondii* [66].

Furthermore, two decades ago, a series of potent ODC inhibitors were synthesized. These compounds belong to the group of 3-amino-oxy-1-propanamine (APA) [67, 68], such as CGP52622A and CGP54619A which reversibly inhibit the *Pf*ODC with IC₅₀-values at the nano-molar range (Table 3). APA itself had an IC₅₀-value of 1 μM revealing a 1000 fold stronger anti-plasmodial effect than DFMO (IC₅₀ value of 1.3 mM) (Table 3). However, APA and its analogues failed as drug candidates in the mouse model [69].

Another interesting PLP-mimicking compound is the cyclic pyridoxyl-tryptophan methyl ester PT3 which inhibits in its phosphorylated form the proliferation of *P. falciparum* at the cellular level (IC₅₀-value of 14 μM) without harming human cells [32]. Two further compounds of this chemical group, PPHME and PPT5, act as inhibitors of the plasmodial ODC with IC₅₀-values of 58 μM and 64 μM respectively [32].

The *P. falciparum* aspartate aminotransferase (AspAT)

Aspartate aminotransferases are involved in three different metabolic pathways. AspAT is responsible for the reversible catalysis of L-aspartate (Asp) into oxaloacetate (OAA) and α-ketoglutarate (2OG) into and L-glutamate (Glu) [70]. Bulusu and collaborators [71] highlighted that AspAT also acts together with the fumarate hydratase (FH) and the malate-quinone oxidoreductase (MQO) in the conversion of fumarate to aspartate. The enzyme has also been

described to accept α -ketomethylthiobutyrate as substrate in order to generate methionine [72]. Like all other aminotransferases, AspAT is structurally classified as a PLP-dependent enzyme of the subgroup I as outlined above [73].

In the malaria parasite AspAT is localised in the cytosol and reveals a homodimeric structure with two joint active site regions formed by both subunits [74-76]. Special attention has been drawn on the plasmodial AspAT (pdb code 3K7Y) which possesses an N-terminal extended region that is required for the dimerisation process (Figure 2). This was already exploited for the design of peptides which can bind to the N-terminal domain and thereby prevent the formation of the homodimer and the enzymatic activity [67]. Interestingly the plasmodial N-terminal region differs significantly from the human counterpart, so that the peptides did not affect the human AspAT [70]. Furthermore, the latter activity assays were also performed with *P. falciparum* protein extracts which prevented AspAT activity suggesting that the malaria parasite possesses no other enzyme that can take over the respective catalysis [70, 77].

Serine hydroxymethyltransferase (SHMT)

As mentioned before, the folate metabolism in *P. falciparum* is a verified drug-target and enzymatic reactions catalysed e.g. by the dihydrofolate reductase (DHFR) are already exploited by the classic antimalarials pyrimethamine and cycloguanil [78]. Another enzymatic step within the folate metabolism is carried out by the serine hydroxymethyltransferase (SHMT), catalysing the transfer of a one-carbon (C1)-unit from serine to tetrahydrofolate to generate 5,10-methylene tetrahydrofolate and glycine, this α -

elimination catalysis is PLP-dependent and thereby belonging to the subgroup I [79].

The folate metabolism is of particular interest because it is involved in the pyrimidine biosynthesis which is required for the DNA synthesis. Since the SHMT is part of the folate metabolism its transcription profile is increased in the S-phase of the DNA replication [80]. Due to the importance of this enzyme, SHMT is considered as a potential drug-target in cancer research [81, 82]. In this sense, inhibitors against tumour cells have already been developed, which are intended to mimic nucleosides in order to be subsequently incorporated into the DNA and thereby leading to its fragmentation [83]. The SHMT of *P. falciparum* has been analysed for its functionality by complementation assay in *E. coli* [84]. Moreover, activity assays using the recombinantly expressed *Pf*SHMT showed that the enzyme accepts in addition to the natural substrate - unlike its mammal counterpart - D-serine. This lack in stereo-specificity has also been observed for the respective *P. vivax* enzyme [85]. Further the plasmodial enzyme can be also inhibited competitively by glycine and serine [86].

Since the substrates of SHMT and DHFR are structurally similar (Figure 4), pyrimethamine, a potent inhibitor of the plasmodial DHFR, has also been tested on the recombinant SHMT, however only with a marginal effect (IC_{50} -value in the mid micro-molar range) [87]. The comparison between the active site of the human enzyme and the plasmodial one showed a high degree of similarity as illustrated in figure 4 [88], but in contrast to the mammalian SHMT, which reveals an homotetrameric structure, the structural conformation of plasmodial protein pointed towards a homodimeric

appearance due to the lack of amino acid residues proposed to be involved in tetramerisation (like the His 135 and a poly-K sequence in the N-terminal domain) [88].

Despite all the similarities between the human and the malaria SHMT, the plasmodial enzyme possesses some peculiarities in the regulation of the folate metabolism such as the binding to its own RNA [87], thus inhibiting protein translation [89].

Recently a second open reading frame encoding for a potential mitochondrial SHMT (PF14_0534, mSHMT) has been identified in *P. falciparum*. However, in comparison to other SHMTs the active site of the plasmodial mSHMT does not reveal preserved amino acid residues [87, 90].

Druggable PLP-dependent enzymes in the malaria vector

Within the life cycle of *P. falciparum* the necessity of PLP-dependent enzymes is not only restricted to the parasite. In order to complete its life cycle, sexual forms of the parasite have to be taken up via the blood meal of the *Anopheles* vector to enter the mosquito gut [3]. Subsequently, the gametogenesis is induced in the mosquito stage by *Anopheles* derived triggers [91]. One of these molecules, that has been described to play a role in this event, is xanthurenic acid (XA) [91]. XA is generated by a transamination reaction of 3-hydroxykynurenine (3-HK) which is catalysed by the PLP-dependent *A. gambiae* 3-HK transaminase (AgHKT), an enzyme classified to the subgroup I. This reaction is necessary to prevent accumulation of the 3-HK, which can become a toxic molecule if it undergoes spontaneous oxidation and thereby generates ROS [91, 92]. The three-dimensional structure of the

recombinant AgHKT was solved as a homodimer with a PLP molecule located in its active site [39, 73]. Currently, there are no inhibitors known to target the AgHKT, although structural information would enable *in silico* based drug-design [92]. Selective interference with the mosquito HKT would prevent the synthesis of XA and thereby offers the opportunity to block the life cycle of the malaria parasite in the mosquito stage.

Conclusion

Although the mortality of malaria infections is declining, the disease, of which Malaria tropica (caused by *P. falciparum*) is the most fatal form, belongs still to the most important infectious disease to man. Due to the spreading degree of resistance against the current chemotherapeutics there is an urgent need to discover novel drugs which should have the ability to selectively interfere with the proliferation of this human pathogen. In this sense, the unique plasmodial cofactor metabolism becomes, due to the variety of cofactor-dependent enzymes, an attractive drug target. In particular PLP-dependent enzymes are widely distributed in the metabolism of *P. falciparum* and responsible for plenty of essential catalyses such as the reactions carried out by the ODC, AspAT or SHMT as outlined in this mini-review. Hence, drug discovery towards inhibition of cofactor-binding would not only target single enzymes, moreover the entire family of PLP-dependent proteins would be affected. This would certainly lead to the death of the parasite. However, the respective PLP-dependent host enzymes have to be taken into account. Therefore, the selective impairment of the malaria specific vitamin B6 biosynthesis should be considered.

Acknowledgements:

This work was financially supported by the grants 2009/54325-2, 2010/20647-0, 2011/13706-3, 2011/19703-6, 2012/12807-3, 2012/12790-3 and 2013/10288-1 from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- [1] (WHO), W. H. O., Geneva, Switzerland. 2011.
- [2] Sabbatani, S., Fiorino, S., Manfredi, R., The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern? *Braz J Infect Dis*, 14, 299-309.
- [3] Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H., *et al.*, Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest* 2008, 118, 1266-1276.
- [4] Cohen, J. M., Smith, D. L., Cotter, C., Ward, A., *et al.*, Malaria resurgence: a systematic review and assessment of its causes. *Malar J* 2012, 11, 122.
- [5] Heppner, D. G., The malaria vaccine--status quo 2013. *Travel medicine and infectious disease* 2013, 11, 2-7.
- [6] Riley, E. M., Stewart, V. A., Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nature medicine* 2013, 19, 168-178.
- [7] Kronenberger, T., Schettert, I., Wrenger, C., Targeting the vitamin biosynthesis pathways for the treatment of malaria. *Future Med Chem*, 5, 769-779.
- [8] Nzila, A., Ward, S. A., Marsh, K., Sims, P. F., Hyde, J. E., Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part I): pointers for malaria treatment from cancer chemotherapy. *Trends Parasitol* 2005, 21, 292-298.
- [9] Burrows, J. N., Antimalarial drug discovery: where next? *Future Med Chem*, 4, 2233-2235.
- [10] Bhattarai, A., Ali, A. S., Kachur, S. P., Martensson, A., *et al.*, Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. *PLoS Med* 2007, 4, e309.
- [11] Olliaro, P., Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol Ther* 2001, 89, 207-219.
- [12] Muller, I. B., Hyde, J. E., Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. *Future Microbiol*, 5, 1857-1873.
- [13] Muller, I. B., Hyde, J. E., Wrenger, C., Vitamin B metabolism in *Plasmodium falciparum* as a source of drug targets. *Trends Parasitol*, 26, 35-43.
- [14] Friedrich, W., *Vitamins*, Walter de Gruyter, Berlin 1988.
- [15] Percudani, R., Peracchi, A., A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep* 2003, 4, 850-854.
- [16] Fitzpatrick, T. B., Amrhein, N., Kappes, B., Macheroux, P., *et al.*, Two independent routes of de novo vitamin B6 biosynthesis: not that different after all. *Biochem J* 2007, 407, 1-13.
- [17] Lam, H. M., Tancula, E., Dempsey, W. B., Winkler, M. E., Suppression of insertions in the complex *pdxJ* operon of *Escherichia coli* K-12 by *lon* and other mutations. *J Bacteriol* 1992, 174, 1554-1567.
- [18] Roa, B. B., Connolly, D. M., Winkler, M. E., Overlap between *pdxA* and *ksgA* in the complex *pdxA-ksgA-apaG-apaH* operon of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1989, 171, 4767-4777.
- [19] Knockel, J., Muller, I. B., Bergmann, B., Walter, R. D., Wrenger, C., The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* generates pyridoxal phosphate de novo. *Mol Biochem Parasitol* 2007, 152, 108-111.
- [20] Wrenger, C., Eschbach, M. L., Muller, I. B., Warnecke, D., Walter, R. D., Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2005, 280, 5242-5248.
- [21] Gengenbacher, M., Fitzpatrick, T. B., Raschle, T., Flicker, K., *et al.*, Vitamin B6 biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights. *J Biol Chem* 2006, 281, 3633-3641.
- [22] Ehrenschaft, M., Bilski, P., Li, M. Y., Chignell, C. F., Daub, M. E., A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96, 9374-9378.
- [23] Ehrenschaft, M., Jenns, A. E., Chung, K. R., Daub, M. E., SOR1, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora* fungi, is highly conserved in divergent organisms. *Mol Cell* 1998, 1, 603-609.
- [24] Strohmeier, M., Raschle, T., Mazurkiewicz, J., Rippe, K., *et al.*, Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103, 19284-19289.
- [25] Zhu, J., Burgner, J. W., Harms, E., Belitsky, B. R., Smith, J. L., A new arrangement of (beta/alpha)8 barrels in the synthase subunit of PLP synthase. *J Biol Chem* 2005, 280, 27914-27923.
- [26] Muller, I. B., Knockel, J., Groves, M. R., Jordanova, R., *et al.*, The assembly of the plasmodial PLP synthase complex follows a defined course. *PLoS One* 2008, 3, e1815.

- [27] Reeksting, S. B., Muller, I. B., Burger, P. B., Burgos, E. S., *et al.*, Exploring inhibition of Pdx1, a component of the PLP synthase complex of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*.
- [28] Knockel, J., Muller, I. B., Butzloff, S., Bergmann, B., *et al.*, The antioxidative effect of de novo generated vitamin B6 in *Plasmodium falciparum* validated by protein interference. *Biochem J*, 443, 397-405.
- [29] Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J. L., Roberts, D., *et al.*, Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol* 2004, 34, 163-189.
- [30] Muller, S., Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2004, 53, 1291-1305.
- [31] Knockel, J., Bergmann, B., Muller, I. B., Rathaur, S., *et al.*, Filling the gap of intracellular dephosphorylation in the *Plasmodium falciparum* vitamin B1 biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol* 2008, 157, 241-243.
- [32] Muller, I. B., Wu, F., Bergmann, B., Knockel, J., *et al.*, Poisoning pyridoxal 5-phosphate-dependent enzymes: a new strategy to target the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 2009, 4, e4406.
- [33] Copley, S. D., Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr Opin Chem Biol* 2003, 7, 265-272.
- [34] Romo, A. J., Liu, H. W., Mechanisms and structures of vitamin B(6)-dependent enzymes involved in deoxy sugar biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1814, 1534-1547.
- [35] Palm, D., Klein, H. W., Schinzel, R., Buehner, M., Helmreich, E. J., The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis. *Biochemistry* 1990, 29, 1099-1107.
- [36] John, R. A., Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1248, 81-96.
- [37] Kirsch, J. F., Eichele, G., Ford, G. C., Vincent, M. G., *et al.*, Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure. *J Mol Biol* 1984, 174, 497-525.
- [38] Mehta, P. K., Christen, P., The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 2000, 74, 129-184.
- [39] Christen, P., Mehta, P. K., From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Chem Rec* 2001, 1, 436-447.
- [40] Amadasi, A., Bertoldi, M., Contestabile, R., Bettati, S., *et al.*, Pyridoxal 5'-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents. *Curr Med Chem* 2007, 14, 1291-1324.
- [41] Kappes, B., Tews, I., Binter, A., Macheroux, P., PLP-dependent enzymes as potential drug targets for protozoan diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1814, 1567-1576.
- [42] Storici, P., De Biase, D., Bossa, F., Bruno, S., *et al.*, Structures of gamma-aminobutyric acid (GABA) aminotransferase, a pyridoxal 5'-phosphate, and [2Fe-2S] cluster-containing enzyme, complexed with gamma-ethynyl-GABA and with the antiepilepsy drug vigabatrin. *J Biol Chem* 2004, 279, 363-373.
- [43] Stamper, G. F., Morollo, A. A., Ringe, D., Reaction of alanine racemase with 1-aminoethylphosphonic acid forms a stable external aldimine. *Biochemistry* 1998, 37, 10438-10445.
- [44] Wu, F., Gehring, H., Structural requirements for novel coenzyme-substrate derivatives to inhibit intracellular ornithine decarboxylase and cell proliferation. *FASEB J* 2009, 23, 565-574.
- [45] Tabor, C. W., Tabor, H., Polyamines. *Annu Rev Biochem* 1984, 53, 749-790.
- [46] Tabor, C. W., Tabor, H., Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev* 1985, 49, 81-99.
- [47] Wallace, H. M., Fraser, A. V., Hughes, A., A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 2003, 376, 1-14.
- [48] Muller, S., Da'dara, A., Luersen, K., Wrenger, C., *et al.*, In the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, polyamines are synthesized by a bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase. *J Biol Chem* 2000, 275, 8097-8102.
- [49] Ivanetich, K. M., Santi, D. V., Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. *FASEB J* 1990, 4, 1591-1597.
- [50] Bzik, D. J., Li, W. B., Horii, T., Inselburg, J., Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, 84, 8360-8364.
- [51] Triglia, T., Cowman, A. F., Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91, 7149-7153.
- [52] Clarke, J. L., Scopes, D. A., Sodeinde, O., Mason, P. J., Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase. A novel bifunctional enzyme in malaria parasites. *Eur J Biochem* 2001, 268, 2013-2019.
- [53] Carucci, D. J., Witney, A. A., Muhia, D. K., Warhurst, D. C., *et al.*, Guanylyl cyclase activity associated with putative bifunctional integral membrane proteins in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2000, 275, 22147-22156.

- [54] Muller, I. B., Das Gupta, R., Luersen, K., Wrenger, C., Walter, R. D., Assessing the polyamine metabolism of *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. *Mol Biochem Parasitol* 2008, *160*, 1-7.
- [55] Birkholtz, L., Joubert, F., Neitz, A. W., Louw, A. I., Comparative properties of a three-dimensional model of *Plasmodium falciparum* ornithine decarboxylase. *Proteins* 2003, *50*, 464-473.
- [56] Heller, J. S., Canellakis, E. S., Bussolotti, D. L., Coward, J. K., Stable multisubstrate adducts as enzyme inhibitors. Potent inhibition of ornithine decarboxylase by N-(5'-phosphopyridoxyl)-ornithine. *Biochim Biophys Acta* 1975, *403*, 197-207.
- [57] Assaraf, Y. G., Golenser, J., Spira, D. T., Bachrach, U., Polyamine levels and the activity of their biosynthetic enzymes in human erythrocytes infected with the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 1984, *222*, 815-819.
- [58] Assaraf, Y. G., Kahana, C., Spira, D. T., Bachrach, U., *Plasmodium falciparum*: purification, properties, and immunochemical study of ornithine decarboxylase, the key enzyme in polyamine biosynthesis. *Exp Parasitol* 1988, *67*, 20-30.
- [59] Bitonti, A. J., McCann, P. P., Sjoerdsma, A., *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*: effects of ornithine decarboxylase inhibitors on erythrocytic schizogony. *Exp Parasitol* 1987, *64*, 237-243.
- [60] Hollingdale, M. R., McCann, P. P., Sjoerdsma, A., *Plasmodium berghei*: inhibitors of ornithine decarboxylase block exoerythrocytic schizogony. *Exp Parasitol* 1985, *60*, 111-117.
- [61] Bitonti, A. J., Dumont, J. A., Bush, T. L., Edwards, M. L., *et al.*, Bis(benzyl)polyamine analogs inhibit the growth of chloroquine-resistant human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*) in vitro and in combination with alpha-difluoromethylornithine cure murine malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, *86*, 651-655.
- [62] Bacchi, C. J., Nathan, H. C., Hutner, S. H., McCann, P. P., Sjoerdsma, A., Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. *Science* 1980, *210*, 332-334.
- [63] Burri, C., Brun, R., Eflornithine for the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitol Res* 2003, *90 Supp 1*, S49-52.
- [64] Sjoerdsma, A., Schechter, P. J., Eflornithine for African sleeping sickness. *Lancet* 1999, *354*, 254.
- [65] Moon, H. W., Schwartz, A., Welch, M. J., McCann, P. P., Runnels, P. L., Experimental fecal transmission of human cryptosporidia to pigs, and attempted treatment with an ornithine decarboxylase inhibitor. *Vet Pathol* 1982, *19*, 700-707.
- [66] Derouin, F., Chastang, C., Enzyme immunoassay to assess effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *Antimicrob Agents Chemother* 1988, *32*, 303-307.
- [67] Mett, H., Stanek, J., Lopez-Ballester, J. A., Janne, J., *et al.*, Pharmacological properties of the ornithine decarboxylase inhibitor 3-aminooxy-1-propanamine and several structural analogues. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993, *32*, 39-45.
- [68] Stanek, J., Frei, J., Mett, H., Schneider, P., Regenass, U., 2-substituted 3-(aminooxy)propanamines as inhibitors of ornithine decarboxylase: synthesis and biological activity. *J Med Chem* 1992, *35*, 1339-1344.
- [69] Das Gupta, R., Krause-Ihle, T., Bergmann, B., Muller, I. B., *et al.*, 3-Aminooxy-1-aminopropane and derivatives have an antiproliferative effect on cultured *Plasmodium falciparum* by decreasing intracellular polyamine concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, *49*, 2857-2864.
- [70] Wrenger, C., Muller, I. B., Schifferdecker, A. J., Jain, R., *et al.*, Specific inhibition of the aspartate aminotransferase of *Plasmodium falciparum*. *Journal of molecular biology* 2011, *405*, 956-971.
- [71] Bulusu, V., Jayaraman, V., Balaram, H., Metabolic fate of fumarate, a side product of the purine salvage pathway in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, *286*, 9236-9245.
- [72] Berger, L. C., Wilson, J., Wood, P., Berger, B. J., Methionine regeneration and aspartate aminotransferase in parasitic protozoa. *J Bacteriol* 2001, *183*, 4421-4434.
- [73] Mehta, P. K., Hale, T. I., Christen, P., Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur J Biochem* 1993, *214*, 549-561.
- [74] Jain, R., Jordanova, R., Muller, I. B., Wrenger, C., Groves, M. R., Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the aspartate aminotransferase of *Plasmodium falciparum*. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 2010, *66*, 409-412.
- [75] Liu, D., Pozharski, E., Lepore, B. W., Fu, M., *et al.*, Inactivation of *Escherichia coli* L-aspartate aminotransferase by (S)-4-amino-4,5-dihydro-2-thiophenecarboxylic acid reveals "a tale of two mechanisms". *Biochemistry* 2007, *46*, 10517-10527.
- [76] Wrenger, C., Muller, I. B., Silber, A. M., Jordanova, R., *et al.*, Aspartate aminotransferase: bridging carbohydrate and energy metabolism in *Plasmodium falciparum*. *Curr Drug Metab*, *13*, 332-336.
- [77] Wrenger, C., Muller, I. B., Silber, A. M., Jordanova, R., *et al.*, Aspartate aminotransferase: bridging carbohydrate and energy metabolism in *Plasmodium falciparum*. *Current drug metabolism* 2012, *13*, 332-336.

- [78] Nzila, A., The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *J Antimicrob Chemother* 2006, 57, 1043-1054.
- [79] Schirch, V., Szebenyi, D. M., Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Curr Opin Chem Biol* 2005, 9, 482-487.
- [80] Nirmalan, N., Wang, P., Sims, P. F., Hyde, J. E., Transcriptional analysis of genes encoding enzymes of the folate pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2002, 46, 179-190.
- [81] Agrawal, S., Kumar, A., Srivastava, V., Mishra, B. N., Cloning, expression, activity and folding studies of serine hydroxymethyltransferase: a target enzyme for cancer chemotherapy. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2003, 6, 67-75.
- [82] Eichler, H. G., Hubbard, R., Snell, K., The role of serine hydroxymethyltransferase in cell proliferation: DNA synthesis from serine following mitogenic stimulation of lymphocytes. *Biosci Rep* 1981, 1, 101-106.
- [83] Yoshioka, A., Tanaka, S., Hiraoka, O., Koyama, Y., *et al.*, Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *J Biol Chem* 1987, 262, 8235-8241.
- [84] Alfadhli, S., Rathod, P. K., Gene organization of a *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase and its functional expression in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol* 2000, 110, 283-291.
- [85] Sopitthummakhun, K., Maenpuen, S., Yuthavong, Y., Leartsakulpanich, U., Chaiyen, P., Serine hydroxymethyltransferase from *Plasmodium vivax* is different in substrate specificity from its homologues. *FEBS J* 2009, 276, 4023-4036.
- [86] Maenpuen, S., Sopitthummakhun, K., Yuthavong, Y., Chaiyen, P., Leartsakulpanich, U., Characterization of *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase-A potential antimalarial target. *Mol Biochem Parasitol* 2009, 168, 63-73.
- [87] Pang, C. K., Hunter, J. H., Gujjar, R., Podutoori, R., *et al.*, Catalytic and ligand-binding characteristics of *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase. *Mol Biochem Parasitol* 2009, 168, 74-83.
- [88] Franca, T. C., Pascutti, P. G., Ramalho, T. C., Figueroa-Villar, J. D., A three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase in complex with glycine and 5-formyl-tetrahydrofolate. Homology modeling and molecular dynamics. *Biophys Chem* 2005, 115, 1-10.
- [89] Chu, E., Takimoto, C. H., Voeller, D., Grem, J. L., Allegra, C. J., Specific binding of human dihydrofolate reductase protein to dihydrofolate reductase messenger RNA in vitro. *Biochemistry* 1993, 32, 4756-4760.
- [90] Salcedo, E., Sims, P. F., Hyde, J. E., A glycine-cleavage complex as part of the folate one-carbon metabolism of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 2005, 21, 406-411.
- [91] Garcia, G. E., Wirtz, R. A., Barr, J. R., Woolfitt, A., Rosenberg, R., Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite. *J Biol Chem* 1998, 273, 12003-12005.
- [92] Rossi, F., Garavaglia, S., Giovenzana, G. B., Arca, B., *et al.*, Crystal structure of the *Anopheles gambiae* 3-hydroxykynurenine transaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103, 5711-5716.
- [93] Varadharajan, S., Dhanasekaran, S., Bonday, Z. Q., Rangarajan, P. N., Padmanaban, G., Involvement of delta-aminolaevulinate synthase encoded by the parasite gene in de novo haem synthesis by *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 2002, 367, 321-327.
- [94] Gafan, C., Wilson, J., Berger, L. C., Berger, B. J., Characterization of the ornithine aminotransferase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2001, 118, 1-10.
- [95] Birkholtz, L. M., Wrenger, C., Joubert, F., Wells, G. A., *et al.*, Parasite-specific inserts in the bifunctional S-adenosylmethionine decarboxylase/ornithine decarboxylase of *Plasmodium falciparum* modulate catalytic activities and domain interactions. *Biochem J* 2004, 377, 439-448.
- [96] Krause, T., Luersen, K., Wrenger, C., Gilberger, T. W., *et al.*, The ornithine decarboxylase domain of the bifunctional ornithine decarboxylase/S-adenosylmethionine decarboxylase of *Plasmodium falciparum*: recombinant expression and catalytic properties of two different constructs. *Biochem J* 2000, 352 Pt 2, 287-292.
- [97] van Brummelen, A. C., Olszewski, K. L., Wilinski, D., Llinas, M., *et al.*, Co-inhibition of *Plasmodium falciparum* S-adenosylmethionine decarboxylase/ornithine decarboxylase reveals perturbation-specific compensatory mechanisms by transcriptome, proteome, and metabolome analyses. *J Biol Chem* 2009, 284, 4635-4646.
- [98] Williams, M., Sprenger, J., Human, E., Al-Karadaghi, S., *et al.*, Biochemical characterisation and novel classification of monofunctional S-adenosylmethionine decarboxylase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 180, 17-26.

- [99] Blavid, R., Kusch, P., Hauber, J., Eschweiler, U., *et al.*, Down-regulation of hypusine biosynthesis in *Plasmodium* by inhibition of S-adenosyl-methionine-decarboxylase. *Amino Acids*, 38, 461-469.
- [100] Phillips, M. A., Coffino, P., Wang, C. C., Trypanosoma brucei ornithine decarboxylase: enzyme purification, characterization, and expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1988, 263, 17933-17941.
- [101] Seabra, S. H., DaMatta, R. A., de Mello, F. G., de Souza, W., Endogenous polyamine levels in macrophages is sufficient to support growth of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 2004, 90, 455-460.
- [102] Dixon, M. a. W. E. C., Enzymes, *Enzymes*, Academic Press, New York 1979, p. 1116.

Figure legends:

Figure 1: Chemical structures of vitamin B6.

A) pyridoxine, B) pyridoxal, C) pyridoxamine and D) its active form pyridoxal 5-phosphate

Figure 2: Three dimensional structures of the AspATs.

A) The 3D structure of *PfAspAT* (pdb code 3K7Y) highlighting the three major domains and the N-terminus as additionally shown in the scheme below. B) Comparison between the human AspAT (grey, pdb code 3HLM) and the *P. falciparum* counterpart (dark grey). The respective N-terminal region is illustrated in black.

Figure 3: Comparison of the active site of the human and plasmodial ornithine decarboxylases (ODC).

A) Structures of ODC inhibitors tested against *Plasmodium*. B) A structural homology model of the positions of the *P. falciparum* ODC active site (the respective residues are illustrated in red, amino acid numbering refers to the bifunctional protein) as well as the bound cofactor PLP.

Figure 4: Model of the plasmodial SHMT and their active site residues.

A) Homology model of the SHMT of *P. falciparum* highlighting the three major domains: N-terminal (green), the core and active site (blue) and the C-terminal (orange), and the dimerisation interface with their N- and C-termini. B) The conserved residues Asp208, His211, Thr234 and His236 as well as the *Plasmodium*-specific Thr183 residue within the active site of the *Pf*SHMT as well as its embedded cofactor. Chemical structures of validated inhibitors of the folate metabolism C) WR99210 and D) pyrimethamine.

Table 1: Different classes of PLP-dependent enzymes according to [15, 40]

Group number	Enzyme class/activity	Representative enzymes
1	Aminotransferases and the amino-acid decarboxylases	Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) and the aspartate aminotransferase (AspAT, prototype)
2	Replacement and elimination of C _β -groups	Serine and threonine dehydratases and the tryptophan synthase (prototype)
3	Interconversion of L- and D-amino acids with a common folding (alpha/beta) ₈	Alanine racemase
4	Alanine aminotransferase	D-alanine aminotransferase
5	Glycogen phosphorylase	Glycogen phosphorylase
6	5,6-Aminomutase	D-lysine 5,6-aminomutase
7	2,3-Aminomutase	Lysine 2,3-aminomutase

Table 2: PLP-dependent enzymes in *Plasmodium*

EC - number	EC - name	PlasmoDB number	Annotation according to PlasmoDB	Pathway	Inhibitors	References
2.1.2.1	Glycine hydroxymethyltransferase	PFL1720w, PF14_0534	Serine hydroxymethyltransferase	Folate metabolism	1843U89, AG331, AG337, D1694, GR1, perimetrex, pyrimethamine, WR99210, methotrexate, glycine (competitively)	[86, 87]
2.3.1.37	5-Aminolevulinate synthase	PFL2210w	ALA synthase, aminolevulinate synthase	Tetrapyrrole biosynthesis	Aminomalonate, Ethanolamine, Hemin	[93]
2.6.1.1	Aspartate aminotransferase	PFB0200c	Aspartate aminotransferase	Amino acid and pyrimidine metabolism	Inhibited by his own N-terminal peptide	[70]
2.6.1.13	Ornithine aminotransferase	PFF0435w	Ornithine aminotransferase	Arginine metabolism	L-canaline	[94]
2.6.1.57	Aromatic amino-acid transaminase	PFB0200c	Aspartate aminotransferase	Amino acid and pyrimidine metabolism	-	-
4.1.1.17	Ornithine decarboxylase	PF10_0322	S-Adenosylmethionine decarboxylase/ornithine decarboxylase (bifunctional)	Polyamine biosynthesis	alpha-Difluoromethylornithine, alpha-Difluoroornithine, alpha-DL-Difluoromethylornithine, CGP52622A, putrescine, spermidine	[55, 95-97]
4.1.1.65	Phosphatidylserine decarboxylase	PFI1370c	Phosphatidylserine decarboxylase	Glycerophospholipid metabolism	-	-
4.1.3.38	p-Aminobenzoic acid synthetase	PFI1100w	p-Aminobenzoic acid synthetase, putative	Folate biosynthesis	-	-
4.1.1.50	Adenosylmethionine decarboxylase	PF3D7_1033100	S-Adenosylmethionine decarboxylase/ornithine decarboxylase	Spermidine biosynthesis	CGP48664A, CGP48664, MDL73811	[98, 99]
2.6.1.7	3-Hydroxykynurenine transaminase		belongs to Anopheles	Xanthurenic acid used in parasite for proliferation	-	[92]
Putatives PLP-dependent enzymes						
2.3.1.50	Serine C-palmitoyltransferase	PF14_0155	Serine C-palmitoyltransferase	Sphingolipid metabolism	-	-
2.6.1.42	Branched-chain amino acid aminotransferase	PF14_0557	conserved <i>Plasmodium</i> protein	Pantothenate and CoA biosynthesis	-	-
2.8.1.7	Cysteine desulfurase	PF07_0068, MAL7P1.150	Cysteine desulfurase, putative	Iron-sulfur cluster synthesis	-	-
4.1.1.18	Lysine decarboxylase	PFD0285c, PFD0670c	Lysine decarboxylase, putative	Polyamine metabolism	-	-

Table 3: Comparison of the kinetic and inhibitory properties of ornithine decarboxylases

	<i>P. falciparum</i> *	<i>M. musculus</i>	<i>T. gondii</i>	<i>T. brucei</i>	References
Molecular mass (kDa)	86.4	50-54	14	90	[96, 100]
K_m-value of L-ornithine (μM)	47.3	30-200	-	161	[57, 58, 96]
K_i -value of putrescine (μM)	50.4	600	0.92	-	[96, 101]
K_i-value of DFMO (μM)	87.6	39	0.025	220	[66, 96, 102]
K_i-value of CGP52622A (nM)	20.4	-	-	-	[96]
K_i-value of CGP54619A (nM)	7.9	-	-	-	[96]
IC₅₀-value of putrescine (μM)	157	-	-	-	[96]
IC₅₀-value of CGP52622A (nM)	63.5	25	-	-	[96]
IC₅₀-value of CGP54619A (nM)	25	10	-	-	[96]

*Data derived from the rPf Hinge-ODC [96]