

**FERNANDO DE ASSIS BATISTA**

**O Ensaio de Interferência de Proteínas Oligoméricas  
como Método de Validação de Alvos Antimaláricos**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em biologia da relação patógeno Hospedeiro do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e ao programa de doutorado do departamento Drug Design da Universidade de Groningen para obtenção da dupla Titularidade de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação  
Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Carsten Wrenger  
Co-orientador: Prof. Dr. Mathew R. Groves

Versão parcial

São Paulo  
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Batista, Fernando A.

The Oligomeric Protein Interference Assay Method  
for Validation of Antimalarial Targets / Fernando  
A. Batista; orientador Carsten Wrenger;  
coorientador Matthew R. Groves. -- São Paulo, 2019.  
137 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Plasmodium falciparum. 2. Protein  
Interference Assay. 3. Aspartate Metabolism. 4.  
Drug target validation. I. Wrenger, Carsten,  
orientador. II. Groves, Matthew R., coorientador.  
III. Título.

## **Abstract**

BATISTA, F.A. **The Oligomeric Protein Interference Assay Method for Validation of Antimalarial Targets** 2019. 137p. Ph.D. (Parasitology) - University of Groningen and Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2019.

Malaria is one of the most prevalent human infections worldwide with over 40% of the world's population living in malaria-endemic areas. In the absence of an effective vaccine, emergence of drug-resistant strains requires urgent drug development. Current methods applied to drug target validation, a crucial step in drug discovery, possess several limitations in malaria. The aim of this study was to evaluate whether challenges in the antimalarial validation process can be addressed by incorporating mutant proteins within oligomeric protein complexes of the target organism *in vivo*. We performed structure-based mutagenic experiments interfering with the inter-oligomeric interactions of the enzymes aspartate aminotransferase (*PfAspAT*), malate dehydrogenase (*PfMDH*) and aspartate transcarbamoylase (*PfATC*) from *P. falciparum*. The effect of these mutations on enzyme activity was assessed by specific measurements *in vitro* and in whole cell assays. The capacity of the mutant enzymes to form a complex with their respective wild-type forms was evaluated by co-expression/purification experiments followed by western blot analysis. The effect on proliferation was demonstrated by monitoring growth of cultured parasites in normal RPMI and aspartate-limited media. By disrupting oligomeric interfaces using mutant subunits of the target enzymes, we have clearly demonstrated a significant reduction in specific enzyme activity *in vitro* and in whole cell assays. Moreover, we demonstrated a phenotypic effect of the introduction of these mutant subunits within the parasite, validating the aspartate metabolism from *P. falciparum* as a druggable pathway without recourse to complex genetic approaches. These findings provide an opportunity to further validate components of *Plasmodium* aspartate metabolism as drug targets and suggest the PIA approach as a valuable addition to the current validation toolbox.

**Keywords:** *Plasmodium falciparum*. Protein Interference Assay. Aspartate Metabolism. Drug target validation.

## Overzicht

BATISTA, F.A. **The Oligomeric Protein Interference Assay Method for Validation of Antimalarial Targets** 2019. 137p. Ph.D. (Parasitology) - Rijksuniversiteit Groningen en Instituut voor Biomedische Wetenschappen, Universiteit van Sao Paulo, Sao Paulo, 2019.

Malaria is een van de meest voorkomende infecties bij mensen wereldwijd, waarbij meer dan 40% van de wereldbevolking in malaria-endemische gebieden woont. Bij afwezigheid van een effectief vaccin vereist de opkomst van geneesmiddelresistente stammen dringende ontwikkeling van geneesmiddelen. De huidige methoden die worden toegepast bij de validatie van het doelwit van geneesmiddelen, een cruciale stap bij het ontdekken van geneesmiddelen, hebben verschillende beperkingen bij malaria. Het doel van deze studie was om te evalueren of uitdagingen in het antimalaria-validatieproces kunnen worden aangepakt door mutante eiwitten in vivo in oligomere eiwitcomplexen van het doelorganisme op te nemen. We hebben structuurgebaseerde mutagene experimenten uitgevoerd die interfereren met de inter-oligomere interacties van de enzymen aspartaat aminotransferase (*PfAspAT*), malaat dehydrogenase (*PfMDH*) en aspartaat transcarbamoylase (*PfATC*) van *P. falciparum*. Het effect van deze mutaties op enzymactiviteit werd beoordeeld door specifieke metingen in vitro en in hecelassays.

Het vermogen van de mutante enzymen om een complex te vormen met hun respectieve wildtype vormen werd geevalueerd door co-expressie/zuiveringsexperimenten gevolgd door western-blot-analyse. Het effect op proliferatie werd aangetoond door de groei van gekweekte parasieten in normale RPMI en aspartaat-beperkte media te volgen. Door oligomere raakvlakken te verstoren met behulp van mutante subeenheden van de doel-enzymen, hebben we een significante vermindering van enzymactiviteit in vitro en in vivo aangetoond. Bovendien hebben we een fenotypisch effect aangetoond van de introductie van deze mutante subeenheden in de parasiet, waarbij het aspartaatmetabolisme van *P. falciparum* als een geneeskrachtige Route werd gevalideerd complexe genetische benaderingen. Deze bevindingen bieden een mogelijkheid om componenten van het aspartaatmetabolisme verder te valideren als

geneesmiddeldoelen em suggereren de PIA-benadering als een waardevolle aanvulling op de huidige validatietoolbox.

**Sleutelwoorden:** *Plasmodium falciparum*. Protein Interference Assay. Aspartaatmetabolisme. validatie van geneesmiddeldoelen.

## **Resumo**

BATISTA, F.A. **The Oligomeric Protein Interference Assay Method for Validation of Antimalarial Targets** 2019. 137f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Universidade de Groningen e Instituto de Ciencias Biomedicas, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, 2019.

A malaria e uma das infeccoes humanas mais prevalentes em todo o mundo, com mais de 40% da populacao mundial vivendo em areas endemicas. Na ausencia de uma vacina eficaz, o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos existentes requer desenvolvimento urgente de novos medicamentos. Os metodos atuais aplicados a validacao de alvos terapeuticos, um passo crucial no desenvolvimento de farmacos, possuem varias limitacoes em malaria. O objetivo deste estudo foi avaliar se os desafios encontrados no processo de validacao de alvos antimalaricos podem ser abordados pela incorporacao de subunidades proteicas mutantes a complexos de proteinas oligomericas do organismo-alvo *in vivo*. Foram realizados experimentos com mutantes que, baseados em estruturas cristalograficas, poderiam interferir nas interacoes inter-oligomericas das enzimas aspartato aminotransferase (*PfAspAT*), malato desidrogenase (*PfMDH*) e aspartato transcarbamoilase (*PfATC*) de *P. falciparum*. O efeito dessas mutacoes na atividade enzimática foi avaliado por medicoes de atividade especifica. A capacidade das enzimas mutantes de formar um complexo com as suas respectivas formas selvagem foi avaliada por experimentos de coexpressao/ purificacao seguidas por analise por Western blot. O efeito na proliferacao foi avaliado pelo monitoramento do crescimento de parasitas cultivados em meio RPMI normal e com baixa concentracao de aspartato. Atraves do rompimento de interfaces oligomericas utilizando subunidades mutantes das enzimas alvo, demonstramos claramente uma reducao significativa na atividade enzimatica especifica *in vitro* e em ensaios whole cell. Alem disso, demonstramos o efeito fenotipico da introducao dessas subunidades mutantes diretamente no parasita, validando o

metabolismo do aspartato de *P. falciparum* sem recorrer a abordagens genéticas complexas. Esses achados sugerem a possibilidade de validação de outros componentes do metabolismo do aspartato plasmodial e demonstram que abordagem da PIA representa uma adição valiosa ao painel de métodos de validação atual.

**Palavras-chave:** *Plasmodium falciparum*. Ensaio de Interferência de Proteína. Metabolismo de Aspartato. Validação de Alvos Terapêuticos.