

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUISTA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

SUELEN FERNANDES SILVA

**Estudo funcional e rastreamento de novos inibidores da enzima
desoxi-hipusina sintase de organismos eucariotos patogênicos**

ARARAQUARA - SP

2023

SUELEN FERNANDES SILVA

Estudo funcional e rastreamento de novos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase de organismos eucariotos patogênicos

Tese de Doutorado apresentada ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química, da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Bolsa: Brasil (CAPES) 001

Doutorado Sanduíche: CAPES PRINT

88887.570728/2020-00 Edital nº41/2017

Projeto: CNPq Processo 141241/2019-5

ARARAQUARA - SP

2023

S586e	Silva, Suélen Fernandes Estudo funcional e rastreamento de novos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase de organismos eucariotos patogênicos / Suélen Fernandes Silva. -- Araraquara, 2023 117 f. : il. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientador: Cleslei Fernando Zanelli 1. Doenças tropicais. 2. Malária. 3. Enzimas. 4. Inibidores enzimáticos. 5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Estudo funcional e rastreamento de novos inibidores de enzimas desoxi-hipusina sintase de organismos eucariotos patogênicos"

AUTORA: SUÉLEN FERNANDES SILVA

ORIENTADOR: CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MÁRIO HENRIQUE BENGTON (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual / Instituto de Biologia - UNICAMP - Campinas

Prof. Dr. RAFAEL VICTORIO CARVALHO GUIDO (Participação Virtual)
Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / Instituto de Física - USP - São Carlos

Profa. Dra. MILCA RACHEL DA COSTA RIBEIRO LINS (Participação Virtual)
Universidade Federal do ABC - UFABC - Santo André

Prof. Dr. FELIPE ROBERTI TEIXEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Genética e Evolução / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - UFSCAR - São Carlos

Araraquara, 30 de março de 2023

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Cleslei F. Zanelli", is written over a horizontal line.

*Dedico essa tese a minha vó (in memoriam), por
todo apoio e fé que sempre teve nos meus
sonhos.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus.

Gostaria de agradecer a minha família, pelo amor, cuidado, suporte, incentivo e compreensão que vocês tiveram comigo em todos os momentos desse doutorado. Por entenderem quando eu precisei estar longe e por estarem sempre presentes, mesmo que distantes. Mãe, irmã e vó (*in memorian*), obrigada por todo cuidado e pela força. Agradeço também ao meu pai (*in memorian*), cujos ensinamentos sempre estiveram e estarão comigo.

Obrigada John, também, pelo amor, cuidado e suporte desde o momento em que tivemos a primeira conversa sobre o meu trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli, pelas oportunidades e aprendizado proporcionado nessa jornada.

Aos colegas e amigos do laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos, onde a execução desse projeto começou. Obrigada Marco, Ana, Fer, Weslei, Tati, Marô, Naira, Ná e Mari. E em especial, obrigada Gely, Angélica H. Klippel, que foi minha parceira desde o começo do projeto e com quem eu aprendi muito.

Esse projeto foi realizado em diversas instituições colaboradoras e eu tenho muito a agradecer a todas as elas, pela infraestrutura, acompanhamento e conversas científicas. Muito obrigada por me acolherem e por colaborarem com o projeto.

Na Unicamp, agradeço a Profa. Dra. Elizabeth Bilsland e a todos os pesquisadores do Laboratório de Biologia Sintética; Profa. Dra Katlin Masirer, Prof. Dr. Mário Bengtson e Dr. Rafael Couñago e a todos os pesquisadores do CQMED, pela supervisão e acompanhamento nos experimentos. Todos os pesquisadores, técnicos e equipe administrativa do CQMED auxiliariam de alguma forma e eu sou muito grata.

Em Gotemburgo, agradeço aos colaboradores da Universidade de Gotemburgo e da Chalmers. Obrigado aos grupos dos Professores Per Sunnerhagen e Leif Eriksson, Universidade de Gotemburgo, pelo ano de acolhimento e ensinamentos. Ao grupo do Prof. Ross King na Chalmers e a Dra. Ievgenia Tiukova por me ensinar a trabalhar com o robô Eve.

Aos colegas de trabalho e amigos do intercâmbio em Gotemburgo, meu muito obrigada. O meu ano foi muito melhor por ter vocês ao meu lado, no trabalho e por serem companhia fora do trabalho também. Obrigada Sunniva, Mariana, Domiziano,

Hanna, Paula, Catarina, Bruna, Faiza, Abarna, Rossana, Emily, Carla, Vittorio, Hirepan, Charlène e todos os outros que eu conheci durante esse ano de tanto aprendizado pessoal e profissional.

A todos os professores que colaboraram, direta ou indiretamente, com esse trabalho. Ao corpo docente, a coordenação, aos técnicos e funcionários da Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP, campus Araraquara. E a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, campus Araraquara pelo espaço físico.

Aos professores Drs. Rafael V. Guido, Ana Marisa F. Almeida e Elizabeth Bilisland, pelas contribuições durante a qualificação.

Aos membros da banca da defesa da tese, Profa. Dra. Milca Rachel da Costa Ribeiro Lins, Prof. Dr. Mário Henrique Bengtson, Prof. Dr. Rafael Victório Carvalho Guido e Prof. Dr. Felipe Roberto Teixeira, agradeço pela disponibilidade em participar da defesa e pelas inúmeras contribuições.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço aos órgãos de fomento que financiaram esse projeto e dos quais fui recipiente de bolsas de estudo: CAPES (CAPES PRINT 88887.570728/2020-00 Edital nº41/2017), CNPq (Processo 141241/2019-5), PADC, FAPESP e INCT Centro de Química Medicinal de Acesso Aberto (Processo 14/50897-0) pelo apoio financeiro e institucional.

*“Mas é preciso ter manha, é preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania de ter fé na vida”
Milton Nascimento*

Resumo

A enzima desoxi-hipusina sintase (DHS) catalisa a primeira etapa da modificação pós-traducional do fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A), que é a única proteína conhecida a conter o aminoácido hipusina, proveniente dessa modificação. Ambos eIF5A e DHS são essenciais para a viabilidade celular em eucariotos e a inibição de DHS poderia ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas contra doenças tropicais negligenciadas (DTNs). Nesse trabalho, nós buscamos por inibidores das enzimas DHS de *Leishmania major* e *Plasmodium vivax*, organismos causadores de leishmaniose cutânea e malária, respectivamente. Primeiramente foi realizada a triagem virtual da biblioteca de compostos do banco de dados ChEMBL- NTD. Foram selecionados 9 candidatos, que foram testados em um ensaio automatizado usando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas, contendo o gene DHS endógeno substituído pelos genes DHS de *H. sapiens* (HsDHS), *L. major* (LmDHS) ou *P. vivax* (PvDHS). Dos 9 compostos, três apresentaram resultados promissores *in vivo* a uma concentração de 100 μ M, sendo que o composto GNF-Pf-744 reduziu 65% do crescimento da linhagem *dys1 Δ ::PvDHS*, ChEMBL1081521 inibiu 37% *dys1 Δ ::LmDHS* e GNF-Pf-3738 inibiu 27% de crescimento de *dys1 Δ ::PvDHS* e 33% de *dys1 Δ ::LmDHS*, nessa concentração. A citotoxicidade geral desses compostos foi analisada nas linhagens de mamífero MCF7 e HepG2 e apenas o composto GNF-Pf-3738 foi tóxico em concentrações de até 100 μ M. Além disso, foi realizado um rastreamento de 400 compostos da coleção *The Pathogen box* em *S. cerevisiae*, do qual o composto, MMV676584 reduziu o crescimento da levedura *dys1 Δ* complementada por PvDHS. Um ensaio bioquímico *in vitro*, baseado em fluorescência, foi padronizado para a confirmação da enzima DHS como alvo, no entanto a maioria dos compostos foram fluorescentes no comprimento de onda testado e não puderam ser testados por esse ensaio. Assim, um ensaio de detecção da hipusinação por *western blot* foi padronizado para confirmação dos hits, no qual os compostos GNF-Pf-744 e MMV676584 a 100 μ M reduziram significativamente em 60 e 70% a taxa de eIF5A hipusinado por PvDHS. Os novos ligantes de DHS encontrados nesse trabalho, GNF-Pf-744 e MMV676584, podem ser pontos de partida para o desenvolvimento de novos inibidores para a proteína DHS dos parasitas estudados.

Palavras-chave: desoxi-hipusina sintase; eIF5A; descoberta de drogas; DTNs.

Abstract

The enzyme deoxyhypusine synthase (DHS) catalyzes the first step in the post-translational modification of eukaryotic translation factor 5A (eIF5A), which is the only known protein to contain the amino acid hypusine previous to this modification. Both eIF5A and DHS are essential for cell viability in eukaryotes and DHS inhibition could be a promising strategy for the development of new therapeutic alternatives against neglected tropical diseases (NTDs). In this work, we searched for DHS enzyme inhibitors from *Leishmania major* and *Plasmodium vivax*, organisms that cause cutaneous leishmaniasis and malaria, respectively. First, the virtual screening of the compounds library from the ChEMBL-NTD database was performed. Nine candidates were selected and tested in a robotized assay using genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains containing the endogenous DHS gene replaced by the DHS genes from *H. sapiens* (HsDHS), *L. major* (LmDHS) or *P. vivax* (PvDHS). Of the nine compounds, three showed promising results *in vivo*, reducing the cell growth from the complemented strains at a concentration of 100 μ M, with the compound GNF-Pf-744 reducing 65% of the growth of the *dys1 Δ ::PvDHS* strain, ChEMBL1081521 inhibiting 37% *dys1 Δ ::LmDHS* and GNF-Pf-3738 inhibited 27% growth of *dys1 Δ ::PvDHS* and 33% of *dys1 Δ ::LmDHS* at this concentration. The general cytotoxicity of these compounds was analyzed in the mammalian strains MCF7 and HepG2 and only the compound GNF-Pf-3738 was toxic at concentrations up to 100 μ M. In addition, a screening of 400 compounds from The Pathogen box collection in *S. cerevisiae* was performed, of which the compound, MMV676584 reduced the growth of *dys1 Δ* yeast complemented by PvDHS. An *in vitro* biochemical assay, based on fluorescence, was standardized in order to confirm the DHS enzyme as a target, however, most of the compounds were fluorescent at the tested wavelength and could not be analyzed by this assay. Thus, a western blot detection assay was standardized to confirm the hits, in which the compounds GNF-Pf-744 and MMV676584 at 100 μ M significantly reduced by 60 and 70%, respectively, the rate of eIF5A hypusinated by PvDHS. The new DHS ligands found in this work, GNF-Pf-744 and MMV676584, can be starting points for the development of new inhibitors for the DHS protein of the studied parasites.

Keywords: deoxyhypusine synthase; eIF5A; drug discovery; NTDs.

Lista de Figuras

Figura 1.	Representação da modificação pós-traducional de eIF5A em humanos, catalisada pelas enzimas desoxi-hipusina sintase (DHS) e desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH).....	21
Figura 2.	Atuação de eIF5A na etapa de elongação da tradução.....	22
Figura 3.	Alinhamento global das proteínas DHS de <i>Homo sapiens</i> , <i>Plasmodium vivax</i> , <i>Leishmania major</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	24
Figura 4.	Modelos estruturais por homologia das proteínas DHS de <i>Plasmodium vivax</i> e <i>Leishmania major</i>	54
Figura 5.	Resíduos de ligação de GC7 em HsDHS (PDB ID 6P4V).....	55
Figura 6.	Novos ligantes de PvDHS e LmDHS por rastreamento <i>in silico</i>	58
Figura 7.	Análise em gel de agarose dos fragmentos amplificados por PCR...	61
Figura 8.	Esquema do sítio de clonagem dos genes DHS em pCM188.....	62
Figura 9.	PCR de colônia para confirmação da deleção de <i>DYS1</i> e <i>PDR5</i> nas linhagens complementadas por <i>H. sapiens</i> , <i>B. malayi</i> , <i>L. major</i> e <i>P. vivax</i>	63
Figura 10.	Substituição funcional (complementação) da DHS de <i>S. cerevisiae</i> pelas enzimas ortólogas de <i>H. sapiens</i> , <i>B. malayi</i> , <i>L. major</i> e <i>P. vivax</i> (VZL1464, VZL1400, VZL1474 e VZL1472, Tabela 2).....	63
Figura 11.	O ensaio utilizando a plataforma de <i>S. cerevisiae</i> pode detectar inibidores de DHS.....	65
Figura 12.	PCR de colônia demonstrando inserção de <i>mCherry</i> , <i>Sapphire</i> e <i>Venus</i> no <i>locus</i> de <i>CAN1</i>	67
Figura 13.	PCR de colônia demonstrando inserção de HsDHS e PvDHS no <i>locus</i> de <i>DYS1</i>	68
Figura 14.	Análise da inibição do crescimento por GC7 das linhagens de levedura <i>dys1Δ</i> complementada por diferentes níveis de expressão de HsDHS.....	70
Figura 15.	Análise da inibição do crescimento por GC7 das linhagens de levedura <i>dys1Δ</i> complementada por diferentes níveis de expressão de PvDHS.....	71
Figura 16.	Análise da inibição do crescimento por GC7 em HsDHS e PvDHS...	72

Figura 17.	Teste da inibição do crescimento por GC7 em LmDHS.....	73
Figura 18.	Análise da inibição do crescimento por GC7 das linhagens de levedura <i>dys1Δ</i> complementada por diferentes níveis de expressão de LmDHS.....	73
Figura 19.	Análise do crescimento diferencial na linhagem de levedura complementadas pela enzima DHS de <i>P. vivax</i> na presença dos hits selecionados por triagem virtual (Tabela 7).....	74
Figura 20.	Análise do crescimento diferencial na linhagem de levedura complementada pela DHS de <i>L. major</i> na presença dos hits selecionados por triagem virtual (Tabela 7).....	75
Figura 21.	Curva de crescimento da linhagem de levedura complementada pela DHS de <i>H. sapiens</i> na presença dos hits selecionados por triagem virtual (Tabela 7).....	76
Figura 22.	Curvas de crescimento da linhagem de levedura selvagem (WT) na presença dos hits selecionados por triagem virtual (Tabela 7).....	77
Figura 23.	Crescimento relativo das cepas <i>dys1Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> complementadas por PvDHS, HsDHS e da linhagem selvagem na presença de GNF-Pf-744 e GNF-Pf-3738.....	78
Figura 24.	Crescimento relativo da cepa <i>dys1Δ</i> complementada por LmDHS na presença dos compostos ChEMBL1081521 e GNF-Pf-3738.....	79
Figura 25.	Curvas de crescimento da cepa <i>dys1Δ::PvDHS</i> na presença de compostos da coleção <i>Pathogen box</i>	80
Figura 26.	Crescimento relativo da cepa <i>dys1Δ</i> complementada por PvDHS na presença dos inibidores da coleção <i>Pathogen box</i>	81
Figura 27.	Curvas de crescimento da cepa <i>dys1Δ::HsDHS</i> na presença de compostos da coleção <i>Pathogen box</i>	82
Figura 28.	Curvas de crescimento da linhagem de levedura selvagem (WT) na presença de compostos da coleção <i>Pathogen box</i>	83
Figura 29.	Crescimento relativo das linhagens complementadas por PvDHS e HsDHS na presença do composto MMV676584 (Tabela 8).....	85
Figura 30.	Hipusinação da eIF5A de levedura por linhagens complementadas com DHS de <i>H. sapiens</i> e <i>P. vivax</i>	86

Figura 31.	Hipusinação da eIF5A ao reprimir a expressão de DHS com diferentes concentrações de metionina.....	87
Figura 32.	Hipusinação da eIF5A na presença de GC7.....	88
Figura 33.	Hipusinação da eIF5A na presença de inibidores da PvdHS.....	89
Figura 34.	Determinação de IC ₅₀ dos compostos GNF-Pf-744 (A) e ChEMBL1081521 (B).....	91
Figura 35.	Determinação de IC ₅₀ dos compostos GNF-Pf-3738 (A) e TCMDC-124630 (B).....	92
Figura 36.	Reação parcial catalisada pela DHS.....	93
Figura 37.	Determinação do pH ideal para a reação cinética das enzimas DHS de <i>P. vivax</i> (A) e <i>L. major</i> (B).....	94
Figura 38.	Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial de LmDHS e determinação dos parâmetros cinéticos.....	95
Figura 39.	Determinação do IC ₅₀ para o GC7 em LmDHS.....	96
Figura 40.	Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da PvdHS e determinação do IC ₅₀ para o GC7.....	97
Figura 41.	Determinação do tampão ideal para a reação cinética das enzimas DHS de <i>P. vivax</i>	99
Figura 42.	Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da PvdHS em pH 8,8 e determinação do IC ₅₀ para o GC7.....	100
Figura 43.	Teste da inibição de GNF-Pf-744 nas enzimas HsDHS e PvdHS usando o ensaio enzimático empregando a reação parcial.....	101

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Plasmídeos utilizados nesse trabalho.....	31
Tabela 2.	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas nesse trabalho.....	32
Tabela 3.	Sequência de oligonucleotídeos utilizados no trabalho.....	33
Tabela 4.	Compostos químicos testados neste trabalho.....	35
Tabela 5.	Concentração dos reagentes utilizados nos ensaios enzimáticos...	50
Tabela 6.	Concentração dos reagentes utilizados para PvdHS utilizando outro tampão.....	51
Tabela 7.	<i>Docking score</i> e propriedades químicas dos compostos selecionados por triagem virtual.....	56
Tabela 8.	Compostos que foram seletivos à inibição de PvdHS na concentração de 25 μ M.....	84

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
BmDHS	Desoxi-hipusina sintase de <i>Brugia malayi</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CDS	<i>Coding sequence</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DHS	Desoxi-hipusina sintase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DOOH	Desoxi-hipusina hidroxilase
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino
eEF2	Fator de elongação de eucariotos 2
eIF5A	Fator de tradução de eucariotos 5A
ERBV-1	<i>Equine rhinitis B vírus 1</i>
GC7	N1-guanil-1,7-diaminoheptano
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
G418	<i>Geneticin</i>
HTS	<i>High-throughput screening</i>
HsDHS	Desoxi-hipusina sintase de <i>Homo sapiens</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IF	Intensidade de fluorescência
Ki	Constante de inibição
Km	Constante de Michalis-Menten
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LmDHS	Desoxi-hipusina sintase de <i>Leishmania major</i>
MMV	<i>Medicines for malaria venture</i>
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

OMS	Organização Mundial de Saúde
OPLS4	<i>Optimized potentials for liquid simulations</i>
ORF	<i>Open Reading frame</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PvDHS	Desoxi-hipusina sintase de <i>Plasmodium vivax</i>
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
RPL5	<i>Ribosomal protein L5</i>
RMSD	Desvio médio quadrático
RNA	Ácido ribonucleico
SC	<i>Synthethic Complete</i>
ScDHS	Desoxi-hipusina sintase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis</i>
UAF	Unidades absolutas de fluorescência
WT	<i>Wild type</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs).....	19
1.2. Fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A)	20
1.3. Desoxi-hipusina sintase (DHS)	23
1.4. Estratégias de descoberta de drogas específicas ao alvo	28
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Triagem <i>in silico</i> da coleção de moléculas ChEMBL-NTDs utilizando ancoragem molecular	37
3.2. Geração da primeira versão da plataforma de <i>S. cerevisiae</i> com substituição da DHS endógena pelas enzimas DHS dos organismos patogênicos	38
3.2.1. Clonagem das DHSs dos patógenos eucariotos no vetor de expressão em <i>S. cerevisiae</i>	38
3.2.2. Transformação e seleção do haploide	39
3.2.3. Ensaio de diluição seriada de levedura	39
3.2.4. <i>Western Blot</i> para checagem da complementação funcional	40
3.2.5. Ensaio de curva de crescimento das linhagens complementadas na presença do composto GC7.....	40
3.3. Geração da segunda versão da plataforma de substituição da DHS em <i>S. cerevisiae</i> para teste de inibidores	41
3.3.1. Integração das proteínas fluorescentes <i>mCherry</i> , <i>Sapphire</i> e <i>Venus</i>	42
3.3.2. Deleção de <i>DYS1</i> e integração de DHSs de <i>H. sapiens</i> , <i>P. vivax</i> e <i>L. major</i>	44
3.4. Rastreamento de inibidores das DHS de <i>L. major</i> e <i>P. vivax</i> utilizando ensaio em <i>S. cerevisiae</i>	45
3.4.1. Condições de cultura	45
3.4.2. Validação da plataforma utilizando ensaios fenotípicos em Bioscreen..	45
3.4.3. Ensaios fenotípicos robotizados	46
3.4.4. Avaliação da taxa de hipusinação das linhagens tratadas com metionina ou compostos químicos	47
3.5. Avaliação da citotoxicidade dos candidatos em células de humano	49
3.5.1. Manutenção das linhagens celulares MCF7 e HepG2.....	49
3.5.2. Avaliação da atividade citotóxica dos compostos usando Presto Blue ..	49
3.6. Padronização de ensaio enzimático <i>in vitro</i> para PvDHS e LmDHS	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53

4.1. Triagem <i>in silico</i> da coleção de moléculas do banco de dados ChEMBL-NTDs	53
4.2. Geração da primeira versão plataforma de <i>S. cerevisiae</i> com substituição da DHS endógena pelas enzimas DHS dos organismos patogênicos	59
4.2.1. Clonagem das DHSs dos patógenos eucariotos no vetor de expressão em <i>S. cerevisiae</i>	59
4.2.2. Substituição funcional de ScDHS pelas enzimas DHS de <i>H. sapiens</i> , <i>B. malayi</i> , <i>L. major</i> e <i>P. vivax</i>	62
4.3. Validação da plataforma nas linhagens complementadas pela DHS de <i>H. sapiens</i> , <i>B. malayi</i> e <i>P. vivax</i> para teste de compostos	64
4.4. Geração de uma segunda versão da plataforma de substituição da DHS em <i>S. cerevisiae</i> para teste de inibidores	66
4.4.1. Utilização de deleções de fatores de resistência pleiotrófica a moléculas pequenas	66
4.4.2. Integração das proteínas fluorescentes <i>mCherry</i> , <i>Sapphire</i> e <i>Venus</i>	67
4.4.3. Deleção de <i>DYS1</i> e integração de DHSs de <i>H. sapiens</i> , <i>P. vivax</i> e <i>L. major</i>	68
4.5. Rastreamento de inibidores das DHS de <i>L. major</i> e <i>P. vivax</i> utilizando ensaio em plataforma em <i>S. cerevisiae</i>	69
4.5.1. Validação da plataforma utilizando ensaios fenotípicos em Bioscreen ..	69
4.5.2. Ensaios fenotípicos utilizando robô Eve	73
4.5.3. Avaliação da taxa de hipusinação das linhagens tratadas com metionina ou compostos químicos	86
4.6. Avaliação da citotoxicidade dos candidatos nas linhagens celulares de humano MCF7 e HepG2	90
4.7. Padronização do ensaio enzimático <i>in vitro</i> para LmDHS e PvDHS	92
5. CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	106
Anexos	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)

O termo Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) é utilizado para classificar um grupo de doenças que são causadas por agentes infecciosos ou parasitas e são predominantes em regiões de clima tropical e subtropical. A incidência dessas doenças ocorre principalmente em regiões de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento onde há escassez de saneamento básico e assistência de serviços de saúde (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2020; ENGELS; ZHOU, 2020).

DTNs afetam mais de um bilhão de pessoas no mundo (ENGELS; ZHOU, 2020; HEALTH, 2020) e pelo menos 149 países são endêmicos para pelo menos uma DTN (HEALTH, 2020). Para a maioria dessas doenças não existem estratégias de controles e tratamentos efetivos, uma vez que não há vacina para a maioria e grande parte dos patógenos apresenta resistência às drogas disponíveis (FAIRLAMB et al., 2016; HOERAUF et al., 2011). Além disso, a maioria dos medicamentos disponíveis para o tratamento de DTNs são obsoletos, tóxicos e de eficácia questionável, o que evidencia a necessidade da busca por novas terapias que sejam eficazes e acessíveis (ALTAMURA et al., 2022; GIAROLLA; FERREIRA, 2015).

Atualmente a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica 20 doenças como DTNs, dentre essas 19 são doenças infecciosas, como por exemplo, doença de chagas, tripanossomíases, dengue e leishmanioses (MITRA; MAWSON, 2017). Apesar de a malária ser tradicionalmente uma doença tropical, essa doença foi removida da lista de DTNs da OMS no final da década de 90, ao ser agrupada, juntamente com tuberculose e AIDS, em uma lista de prioridade (*priority “poverty-related” killing diseases*) de condições que deveriam imediatamente receber maior investimento em pesquisa e controle (ENGELS; HUANG; ZHOU, 2021).

Apesar de receber maior investimento em comparação às DTNs, em 2021 existiam aproximadamente 247 milhões de casos de malária e 619.000 mortes devido à essa doença (WHO, 2023a). Não obstante, a malária é uma doença endêmica no Brasil, suas taxas de transmissão tem se mantido constantes, principalmente na região Norte do país (LANA et al., 2021). Em 2018, mais de 5 milhões de casos de malária foram notificados no Brasil, dentre eles 81% eram causados pelo parasita *Plasmodium vivax* (BARROS et al., 2022; LANA et al., 2021). *P. vivax* é conhecido por

causar um tipo de malária supostamente mais branda e raramente letal, no entanto *P. vivax* se aloja por mais tempo no fígado do infectado, o que dificulta o tratamento e eliminação da doença e aumenta o índice de morbidade pela doença (BARROS et al., 2022).

Por outro lado, para leishmaniose é difícil falar de uma estimativa geral de pessoas acometidas, uma vez que há uma grande discrepância entre o número real de ocorrência e o número reportado às organizações de saúde (WHO, 2023b). Estima-se que entre 700.000 e 1 milhão de novos casos ocorrem anualmente e as formas predominantes da doença são a leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea (WHO, 2023b).

1.2. Fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A)

Assim como a maioria dos fatores de tradução, a proteína fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é altamente conservada em eucariotos e arqueias (WOLFF et al., 2007) e é essencial para a viabilidade celular de todos os organismos em que foi estudada até o momento (NISHIMURA et al., 2012; PADGETT et al., 2021; WOLFF et al., 2007). Além disso, eIF5A é essencial para o desenvolvimento embrionário em camundongos (NISHIMURA et al., 2012).

Grande parte do interesse em se estudar eIF5A se dá pelo fato de sua modificação pós-traducional exclusiva (TAUC et al., 2021). Essa modificação, conhecida como hipusinação, é catalisada por duas enzimas, desoxi-hipusina sintase (DHS) e desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH). Primeiramente, DHS catalisa a transferência NAD⁺-dependente da porção 4-aminobutil da poliamina espermidina para um resíduo de lisina específico (K50 em humanos) em eIF5A (PARK; WOLFF, 2018). A lisina previamente modificada é hidroxilada pela desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH), finalizando a maturação de eIF5A (Figura 1A). Essa modificação pós-traducional gera um aminoácido exclusivo chamado hipusina. eIF5A é a única proteína conhecida a conter esse aminoácido (PARK; WOLFF, 2018). Além disso, é conhecido que a reação catalisada por DHS acontece em duas etapas: na primeira etapa da reação catalisada pelo DHS, o substrato espermidina é oxidado a desidroespermidina, de forma dependente de NAD⁺ e um resíduo de lisina conservado ataca a espermidina oxidada formando um aduto covalente enzima-butilimina e liberando propano-1,3-

diamina (Figura 1B); em seguida, o grupo butilimina é transferido para um resíduo de lisina conservado de eIF5A e o NAD^+ é regenerado dentro do sítio ativo DHS.

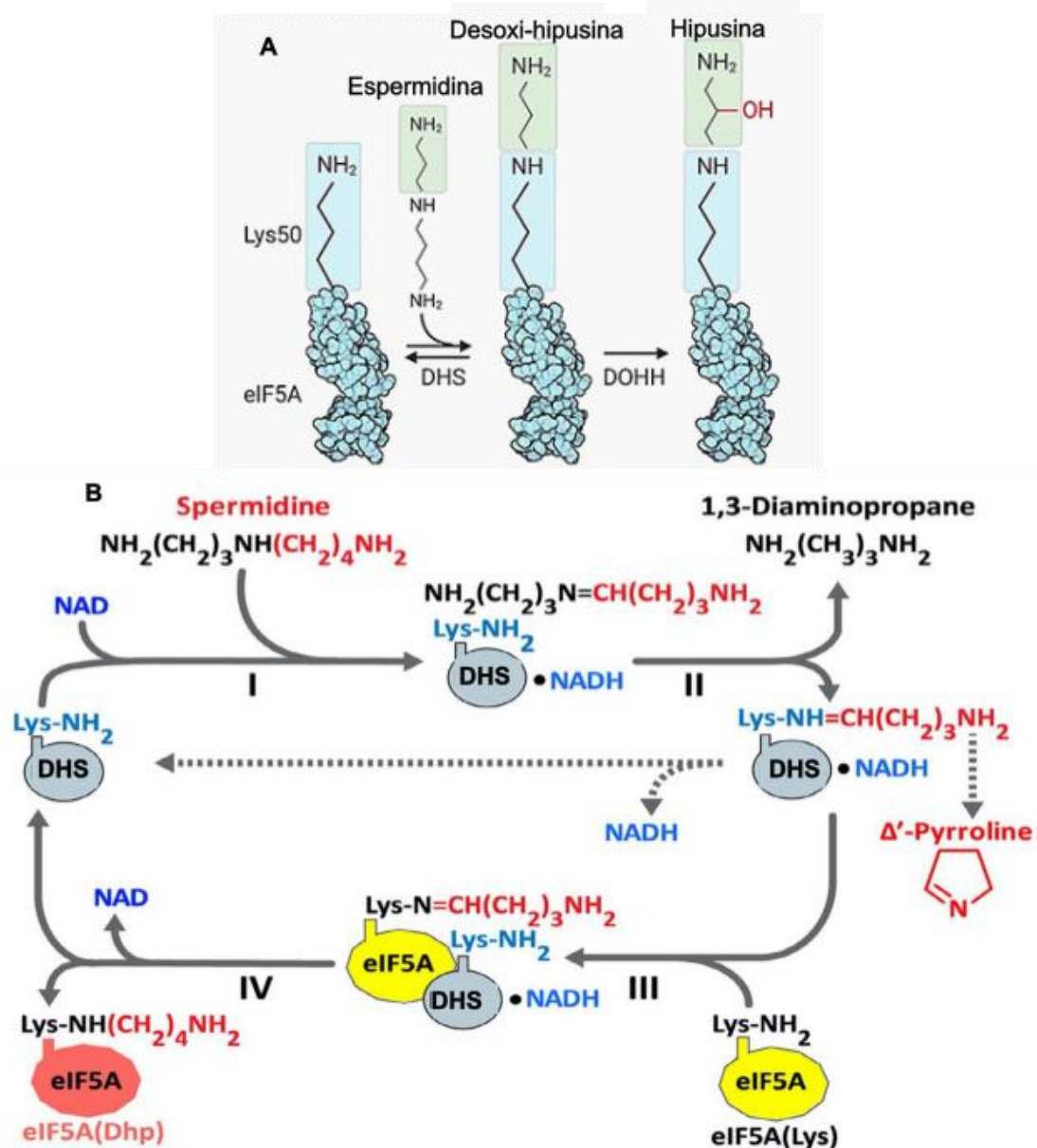


Figura 1. Representação da modificação pós-traducional de eIF5A em humanos, catalisada pelas enzimas desoxi-hipusina sintase (DHS) e desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH). (A) DHS transfere o grupo 4-aminobutil da molécula de espermidina para K50 (lisina 50) de eIF5A. DOHH finaliza a modificação realizando uma hidroxilação na porção aminobutil em K50. Fonte: Adaptado de (D'AGOSTINO et al., 2020). (B) Etapas da reação completa catalisada por DHS, em que a reação ocorre em 4 etapas (I até IV) para formação de desoxi-hipusina-eIF5A (IV): o substrato espermidina é oxidado a desidrospermidina, de forma dependente de NAD^+ (I); um resíduo de lisina conservado ataca a espermidina oxidada formando um aduto covalente enzima-butilimina e liberando propano-1,3-diamina (II); o grupo butilimina é transferido para um resíduo de lisina (III); desoxi-hipusina-eIF5A é formado e o NAD^+ é regenerado dentro do sítio ativo DHS (IV). Fonte: Adaptado de (PARK; WOLFF, 2018b)

eIF5A foi inicialmente caracterizado como fator de início da tradução (eIF5A, fator de iniciação da tradução de eucariotos 5A) (KANG; HERSHEY, 1994), no entanto, vários estudos subsequentes não confirmaram seu papel como um fator geral de iniciação da tradução (MANDAL; MANDAL; PARK, 2016; PELECHANO; ALEPUZ, 2017). Embora eIF5A hipusinado atue na etapa de iniciação da tradução, mantendo a fidelidade de seleção do start codon (IVANOV et al., 2018; MANJUNATH et al., 2019) e na terminação, elevando a taxa de hidrólise da ligação aminoacil-tRNA mediada por eRF1 (fator de liberação de eucariotos 1) (SCHULLER et al., 2017); o seu papel crucial na síntese proteica ocorre na etapa de alongação (Figura 2) (TAUC et al., 2021). Na alongação, eIF5A facilita o trânsito de sequências consecutivas de prolinas que tendem a induzir uma parada ribossomal (PELECHANO; ALEPUZ, 2017; TAUC et al., 2021).

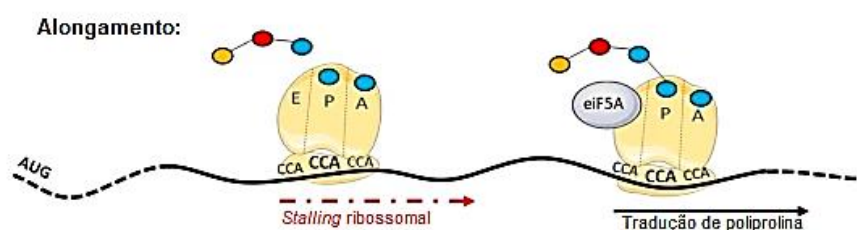


Figura 2. Atuação de eIF5A na etapa de alongação da tradução. Esquerda: *stalling* ribossomal induzido por sequências repetitivas de poliprolina. Direita: eIF5A se liga no sítio E do ribossomo pausado e interage com o peptidil-tRNA situado no sítio P ajudando a promover a formação de ligações peptídicas com o aminoácido situado no sítio A. Fonte: Adaptado de (TAUC et al., 2021).

Até o momento não há estudos mostrando associação entre o papel de eIF5A na síntese proteica e os efeitos fisiológicos fenotípicos em que essa proteína está implicada. Apesar de não completamente elucidado o mecanismo pelo qual isso ocorre, eIF5A está envolvido em diversas condições patológicas, como diabetes (MAIER; TERSEY; MIRMIRA, 2010) e na replicação do vírus HIV-1 (HOQUE et al., 2009). Em adição, diversos estudos destacam a relevância do estudo de eIF5A como alvo terapêutico, principalmente para câncer (CONI et al., 2020; SFAKIANOS; RAVEN; WILLIS, 2022; WU; XU; LAU, 2020), uma vez que eIF5A é altamente expresso durante a tumorigênese de vários tipos de câncer e metástases (NAKANISHI; CLEVELAND, 2016; TAUC et al., 2021). eIF5A foi recentemente

proposto como possível biomarcador para o diagnóstico de hepatocarcinoma (LI et al., 2021).

1.3. Desoxi-hipusina sintase (DHS)

Assim como eIF5A, experimentos de nocaute genético mostraram que a enzima alvo de estudo nesse projeto, desoxi-hipusina sintase (DHS), também é essencial para todos os organismos testados (NISHIMURA et al., 2012; PARK; JOE; KANG, 1998), incluindo organismos eucariotos patogênicos, como: *Fusarium graminearum* (MARTINEZ-ROCHA et al., 2016), *P. falciparum* (AROONSRI et al., 2019) e *Trypanosoma brucei* (NGUYEN et al., 2013).

A maior parte dos organismos com genoma conhecido possui apenas um gene codificando a enzima DHS. No entanto, tripanossomatídeos como, *T. brucei* (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018) e *Leishmania major* apresentam dois genes parálogos que codificam DHS (Figura 3).

1 10 20 30

LmDHSc MANIAESAVLVSSASSAQAVAKLTQVQGP.TSG
TbDHSc MAELAKSAVLVSSCTDDLLGDAKQVVVGNQED
LmDHSp MLAS.....APAPRPAKKDSAASRRKSASKSTGAAVKDDSSARVSASGAEE...SPEQSCTQVHGVDFQS
TbDHSp MS...GVFPFSRVIGDLDYSN
HsDHS MEGSLEREAP.....AGALAAVLKHSS...TLPPESTQVRGYDFNR
PvDHS MTNQGAFKEVNKIRSESDDGESSDEKSGI.....EDAKSSVFVKSN...KIPENTDVVKGINFEE

40 50 60 70 80 90

LmDHSc FDKAQHIIGSYSTMGFQATNYGLARSI AQRMIRKQPPSKVYQIKDGKYVLVPPDVGEDGRTLQQ
TbDHSc LHSAEAVLNRYSTVGFQASNLARAFSICEMMLTPQSPSPSLMPTEGDQ.....ASESP
LmDHSp LVHATQEETLRVAVSSLPPTTGLQATQIGRARQLVQQILHHS.....
TbDHSp LLNIGQEEAIRCVLNAYPNIGLEATNLGRARRIVQRALNDNGM.....
HsDHS GVNYRALLEAFGTTGFQATNFGRAVQQVNAMIEKKLEPLSQD.....EDQH..ADLTQSRR
PvDHS EVNLHQFVNQYKYMGFQATNLGIGIDEVNKMIHFKYAEGGEGTQDGHNDNDHDQD..SDDERQALP

100 110 120 130 140 150 160

LmDHSc EHVYPNLFMGVSA NLMGTGCREAVRF LVQEGVAHRSPEASAAASADGTDQLMFARLKREYVETYGGPPH
TbDHSc VMVQPTLFVGVGTANLFGTGCREAIRFLCTECVPLPNGVEPATPL...DD.....MAGIS...CDGTGA
LmDHSp ..PEDRVFLAYTSNMISCGLRDTFTYLARER.....
TbDHSp ..DGNKVMLAYTSNLISSGLRDTFACLAREN.....
HsDHS PLTSCTIFLGYTSNLISSGIRETIRYLVQHN.....
PvDHS KKKKCLIWLSFTSNMISSGLREIFVYLAKKK.....

170 180 190 200 210 220 230

LmDHSc PDEEVPRAHSLFLCAIVVSGGGVEHD LRRACTAYTLHYAYSEAQGHVSSTISSEATAPLEGLQQR AETPLG
TbDHSc LKPSPCDSRALIHVLVVGSGGMEHD IRRACESYKLSRDGAEEEGEQF.....HHFVE
LmDHSp LVDCFISSAGGIEEDVIKCGGSTLLGQFGLDGR.....
TbDHSp RIGAVVTTAGGVEEDVIKCLGDTLVGDFALNDH.....
HsDHS MVDVLVTTAGGVEEDLIKCLAPTYLGEFSLRGK.....
PvDHS FIDVVVTTAGGVEEDIIKCFSKTYLGDFNLNGK.....

240 250 260 270 280

LmDHSc TGAAAGAAKPARFGNVEYPPQSGSPGSALFDRLMRTFAQRLCARQARLRAAAMA.....
TbDHSc RDRSRSGKGTDCHEGNVRYNSSGVASRNLFSCVMRCLVKRLAEARKEKANREA.....
LmDHSp ...ALRRRGINRIGNLLVPNDNY...CWFEDEFPTPVLESVQEAQRASR.....
TbDHSp ...ALRNNGLN RVGNLLVPNDNY...RNFEDFFVPLLRRLHEQORDSR.....
HsDHS ...ELRENGINRIGNLLVPNENY...CKFEDWLMPLILDQMVMBCONTEG.....
PvDHS ...KLRKKGWN RIGNLVPNDNY...CKFEDWLQPLLNKMLHEONRKNEELFLRKLDKRRRGGGHGGERE

290 300 310 320 330 340

LmDHSc KPIPD....KYDDVCSW..SVTPSEVWALCGLWLVDMLAEALRAVQSCPSHLTSGSGVGT
TbDHSc APIPE....AYYDVCWSW..AITPSTLWYMACGLWMADIFTEALQETGEVT.....
LmDHSp WKHTAPSEFIEAMG.....AAIA.....
TbDHSp WTTKTPSQIIAEIG.....AALE.....
HsDHS VKWTPSKMIARLG.....KEIN.....
PvDHS PPSPPPHTPHAPSPPSPCDSSDEDES DMFYLS PSEFIDKLG.....EEIN.....

350 360 370 380 390 400 410

LmDHSc AESVTANGKGQEADRD AHIATSALYRAEALARARTTVVYWA AVQQVSLFSPSEV DGDITSYLLPTVPVAA
TbDHSc DEKVA SEEGLKRAKSTVLVYWAARNGVPIFSPSLTDG DIMEFILTAGD...
LmDHSp KNHPDCTCSSLVYWCYRNGISVFS PAFTDGS MGDMIFYFNFS..
TbDHSp SVRPND CGSSLIYWCYRNDIPVFS PAFTDGS MGDMIFYFNYS..
HsDHS N.....PESVY YWAQKNHIPVFS PALTDGSLGDMIFFHSYK..
PvDHS D.....ESSLI YWCHKNDIPVFCPGLTDGSLGDNLF FHNHYG..

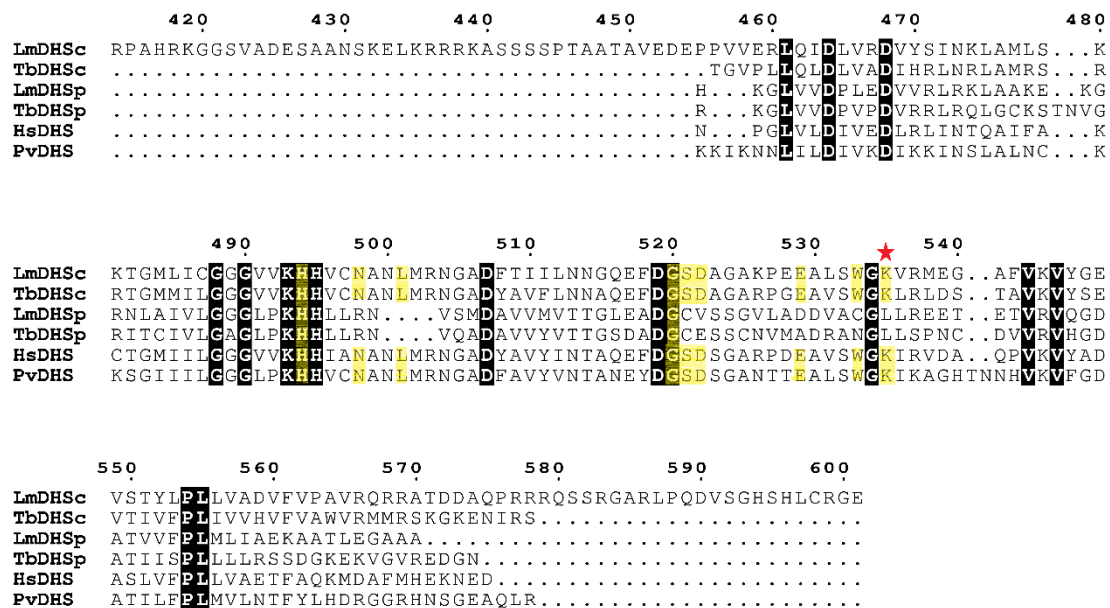


Figura 3. Alinhamento global das proteínas DHS de *Homo sapiens*, *Plasmodium vivax*, *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*. Destacados com fundo preto e letras brancas estão os resíduos idênticos. Os resíduos de ligação ao substrato estão marcados com fundo amarelo. O resíduo de lisina essencial para a atividade catalítica de DHS está marcado por uma estrela vermelha. As sequências de proteínas usadas no alinhamento foram: HsDHS (UniProt ID P49366), PvDHS (UniProt ID Q0KHM1), LmDHSc/LmDHSp (UniProt IDs Q4Q3H5 e Q4QD19) e TbDHSc/TbDHSp (UniProt IDs Q38BX0 e Q4GZD1).

Em *T. brucei* e *L. major*, observa-se ainda, que apenas um dos polipeptídeos (TbDHSc, LmDHSc, respectivamente – Figura 3) possui o resíduo de lisina essencial para a atividade catalítica de DHS (identificado por estrela vermelha, Figura 3) e a maioria dos demais resíduos de interação com o substrato conservados (Figura 3), sendo assim denominadas subunidades catalíticas. Os polipeptídeos parálogos (TbDHSp e LmDHSp – Figura 3) são classificados como subunidades regulatórias. Recentemente foi descrito que o protozoário *Entamoeba histolytica* também possui dois genes que codificam DHS, sendo que apenas um apresenta o resíduo de lisina catalítica (JEELANI; NOZAKI, 2021).

A estrutura cristalográfica de *T. brucei* (PDB 6DFT) (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018) mostra a associação dos polipeptídeos parálogos para a formação de uma proteína heterotetramérica funcional (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018). Separadamente, ambas as pseudoenzimas TbDHSc e TbDHSp carecem de resíduos necessários para ligação ao substrato ou ao cofator, no entanto a formação do heterotetrâmero da combinação das enzimas parálogas resulta em um sítio catalítico compartilhado na interface das subunidades (AFANADOR; TOMCHICK;

PHILLIPS, 2018). No decorrer deste projeto de doutorado, demonstramos, a partir de ensaios funcionais em *Saccharomyces cerevisiae*, que a DHS de *L. major* também requer ambos polipeptídeos parálogos para a formação de uma proteína funcional (SILVA et al., 2020) (descrito adiante em Resultados e Discussão).

Outra diferença marcante em *L. major* é que LmDHSc possui longas inserções de função desconhecida em sua sequência, as quais fazem com que esta tenha uma extensão de 601 resíduos, enquanto a enzima DHS de *H. sapiens* possui 369 aminoácidos e as unidades catalíticas e regulatórias de *T. brucei* são compostas de 461 e 342 aminoácidos, respectivamente (Figura 3). A enzima DHS de *P. vivax* também apresenta inserções em relação à enzima de *H. sapiens*, possuindo uma extensão total de 455 aminoácidos (Figura 3). As diferenças estruturais encontradas entre as enzimas DHS dos organismos patogênicos aqui estudados, *L. major* e *P. vivax*, em relação à enzima de *H. sapiens* poderão ser utilizadas para o futuro desenho de inibidores seletivos aos patógenos.

Um importante fator a se considerar para a progressão de uma proteína em estratégias de desenvolvimento de novos inibidores direcionados ao alvo é a capacidade de modulação da atividade dessa proteína por pequenas moléculas (CHENG et al., 2007; HOPKINS; GROOM, 2002). Neste contexto, diversos estudos mostram a inibição da atividade de DHS por compostos químicos (JAKUS et al., 1993; SCHROEDER et al., 2014; TANAKA et al., 2020b), o que é um ponto de partida para a busca de novos inibidores para DHS. Ainda mais importante é o fato de que a inibição de DHS é continuamente estudada como relevante alternativa terapêutica, principalmente em relação a desordens hiperproliferativas e processos inflamatórios (LIU et al., 2021; PADGETT et al., 2021; SCHROEDER et al., 2014).

Um dos primeiros inibidores da DHS descritos em literatura, GC7 (N1-guanil-1,7-diaminoheptano), é um análogo estrutural do substrato espermidina. Esse potente composto apresenta uma constante de inibição (K_i) de 10 nM para a enzima DHS de *Homo sapiens* (JAKUS et al., 1993) e, além disso, demonstrou potencial antiproliferativo em diversas culturas de células de câncer (CHEN et al., 1996; JASIULIONIS et al., 2007). Apesar disso, até o momento não foram realizados ensaios clínicos com essa molécula, provavelmente devido ao fato de que GC7 não interage seletivamente com DHS. Uma das atuações de GC7, independente da ligação a DHS,

se dá na modulação da biossíntese de poliaminas (LANDAU et al., 2010; OLIVERIO et al., 2014).

Outro inibidor da DHS, a guanilhidrazona CNI-1493, foi capaz de suprimir a replicação do vírus HIV (HAUBER et al., 2005), tendo em vista que eIF5A é um cofator celular da proteína HIV-1- Rev (LIU et al., 2011). Após essa descoberta, triagens virtuais foram realizadas para a descoberta de análogos de CNI-1493 que se liguem à DHS *in silico* (SCHRÖDER et al., 2016).

Uma nova série de inibidores alostéricos da DHS de *H. sapiens* foi desenvolvida por um grupo de pesquisadores ao executarem otimização de moléculas encontradas por rastreamentos em larga escala (TANAKA et al., 2020a, 2020b). Dois novos potentes inibidores, **11g** ($IC_{50} = 0,062 \mu M$) e **26d** ($IC_{50} = 0,0092 \mu M$), foram desenvolvidos, o que ressalta a importância das campanhas de rastreamento em larga escala seguidas de etapas de otimização de moléculas e também da descoberta de novos de sítios de ligação para DHS (TANAKA et al., 2020a, 2020b).

Baseando-se no sítio alostérico descrito para a DHS de *H. sapiens* (TANAKA et al., 2020a), uma outra série de inibidores alostéricos foram sintetizados (LIU et al., 2021). O inibidor **8m** apresentou potente inibição *in vitro* da atividade enzimática da DHS de *H. sapiens* ($IC_{50} = 0,014 \mu M$) e também foi capaz de inibir células de melanoma *in vitro* (LIU et al., 2021).

Em contraste com a vasta quantidade de estudos da inibição da enzima DHS de *H. sapiens*, visando o tratamento de câncer e diabetes (LIU et al., 2021; MAIER; TERSEY; MIRMIRA, 2010; SFAKIANOS; RAVEN; WILLIS, 2022), por exemplo, existem menos projetos voltados para a enzima DHS de organismos patogênicos. Isso ocorre provavelmente devido à falta de informação estrutural e celular para esses organismos (ALTAMURA et al., 2022), além da ausência de inibidores específicos às enzimas DHS de agentes patogênicos.

No entanto, existem na literatura trabalhos demonstrando que GC7 inibiu a atividade enzimática *in vitro* da DHS de alguns organismos patogênicos, como por exemplo: *P. falciparum* (AROONSRI et al., 2019), *T. brucei* (NGUYEN et al., 2013) e *Trichomonas vaginalis* (QUINTAS-GRANADOS et al., 2016). GC7 também inibiu significativamente o crescimento de linhagens transgênicas de *P. falciparum* derivadas da linhagem 3D7 (AROONSRI et al., 2019).

O composto **11g**, ligante do sítio alostérico da DHS de *H. sapiens* (TANAKA et al., 2020a), foi investigado quanto ao seu potencial antimalárico em *P. falciparum* (AROONSRI et al., 2022). O composto apresentou um IC₅₀ de 46,1 µM na linhagem Dd2 e de 51,5 µM na linhagem de *P. falciparum* 3D7, porém, experimentos de perfil quimiogenômico mostraram que DHS não foi o alvo primário ao qual se pode atribuir a inibição do parasita por esse composto (AROONSRI et al., 2022).

1.4. Estratégias de descoberta de drogas específicas ao alvo

Estratégias de descoberta de drogas alvo-específicas (*target-based drug discovery*) tem sido utilizadas para ajudar a desenvolver medicamentos mais seguros e eficazes para DTNs e malária (ALTAMURA et al., 2022; FREARSON et al., 2007). Nesse contexto, a enzima desoxi-hipusina sintase (DHS) pode ser explorada como um potencial alvo.

Como aqui descrito ao longo dos parágrafos anteriores, a busca por novos inibidores utilizando rastreamentos virtuais e rastreamento de coleções de pequenas moléculas em plataformas de ensaios em larga escala tem sido utilizada para a descoberta de novas moléculas que sejam pontos de partida para o desenvolvimento de potentes inibidores para a proteína DHS (SCHROEDER et al., 2014; TANAKA et al., 2020a, 2020b). Essas técnicas também constituem importantes estratégias para a descoberta de novos inibidores específicos contra agentes causadores de DTNs (BARBOSA et al., 2022; RAMOS et al., 2022).

As plataformas mais comumente utilizadas em projetos de descoberta de drogas contra agentes causadores de DTNs são os ensaios bioquímicos *in vitro* ou ensaios fenotípicos em células. Ambas as abordagens possuem algumas desvantagens; por exemplo, as metodologias *in vitro* carecem de um contexto celular e geralmente requerem a purificação de proteínas, já as células podem ser de difícil cultivo e as triagens nem sempre revelam os alvos atingidos (DENNY; STEEL, 2015).

Nesse contexto, a geração de sistemas usando linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas pode superar alguns desses problemas e oferecer uma plataforma econômica para o rastreamento alvo-direcionado dentro de um contexto celular eucariótico (DENNY, 2018). O organismo modelo *S. cerevisiae* apresenta diversas vias conservadas em comparação a outros eucariotos, como humanos e protozoários, o que permite a expressão de proteínas ortólogas, complementação

funcional e análises funcionais em um sistema simplificado (NORCLIFFE et al., 2014). Além disso, já existem métodos avançados para a modificação genética em levedura (DUINA; MILLER; KEENEY, 2014).

Um dos sistemas utilizados para geração de plataformas de descoberta de drogas em levedura é o sistema de substituição de genes essenciais pelo gene ortólogo de interesse para buscar inibidores através da inibição diferencial de crescimento (BILSLAND et al., 2016a; FRAME et al., 2015; TAVELLA et al., 2021b). Já foi demonstrado, em ensaios utilizando essas linhagens complementadas funcionalmente, a capacidade de diferenciação da suscetibilidade de enzimas ortólogas a um mesmo inibidor (BILSLAND et al., 2016a; TAVELLA et al., 2021b).

Tendo em vista a relevância de DHS como alvo para estudos em campanhas de descoberta de fármacos e a possibilidade do desenvolvimento de plataformas de testes de compostos usando *S. cerevisiae*, o objetivo inicial desse projeto consistia na busca de inibidores seletivos, usando *S. cerevisiae*, para as enzimas DHS de cinco espécies causadoras de DTNs: *Brugia malayi*, *Histoplasma capsulatum*, *L. major*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. vivax*. No entanto, devido à redução da capacidade de trabalho durante a pandemia e tentando reduzir o impacto negativo da redução de resultados neste projeto de doutorado, o projeto obteve mais enfoque na busca de inibidores apenas para as enzimas que apresentam mais diferenças estruturais em relação a enzima de humano: *L. major* e *P. vivax*.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo desse projeto de pesquisa consiste na busca de novos possíveis inibidores específicos das enzimas desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major* e *Plasmodium vivax*. Para alcançar essa finalidade, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Triagem virtual da coleção de moléculas do banco de dados ChEMBL-NTDs utilizando docking molecular em estruturas 3D das enzimas de *H. sapiens*, *L. major* e *P. vivax*;
- Desenvolvimento de plataforma de *S. cerevisiae* em que as linhagens contenham o DHS endógeno substituído pelas DHSs de *H. sapiens*, *L. major* e *P. vivax*;
- Ensaio automatizado de inibição dos compostos selecionados por docking contra as DHSs utilizando a plataforma de *S. cerevisiae* gerada;
- Avaliação da citotoxicidade geral dos candidatos em células de humano, MCF7 e HepG2;
- Padronização do ensaio de atividade enzimática *in vitro* e determinação do IC₅₀ dos possíveis inibidores da DHS em ensaio usando as proteínas purificadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A manutenção, cultivo e transformação de linhagens de *E. coli* e *S. cerevisiae*, bem como a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções utilizados nesse trabalho seguiram os procedimentos padrão descritos em manuais de laboratório (BURKE; DAWSON; STEARNS, 2000; FREDERICK M AUSUBEL, 2020) . Os plasmídeos, linhagens de *S. cerevisiae* e oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho estão descritos nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1. Plasmídeos utilizados nesse trabalho.

Nome	Características	Derivado de:	Origem
pCM188	<i>CEN</i> ; <i>URA3</i> ; <i>Amp^R</i> ; TetO-CYC1pr (promotor reprimível por tetraciclina)	-	(GARÍ et al., 1997)
pCM188-MET3	<i>CEN</i> ; <i>URA3</i> ; <i>Amp^R</i> ; MET3pr (promotor reprimível por metionina)	pCM188	(ALALAM et al., 2021)
pWS082	sgRNA entry vector; <i>Amp^R</i>	-	Tom Ellis (Addgene plasmid # 90516)
pWS082-CAN1 sgRNA	sgRNA para CAN1	pWS082	Este trabalho
pWS082-DYS1 sgRNA	sgRNA para DYS1	pWS082	Este trabalho
pWS158	Cas9 gap repair vector; <i>URA3</i> ; <i>Kan^R</i>	-	Tom Ellis (Addgene plasmid # 90517)
pWS172	Cas9 gap repair vector; <i>HIS3</i> ; <i>Kan^R</i>	-	Tom Ellis (Addgene plasmid # 90519)
pCM188-HsDHS	DHS de <i>H. sapiens</i>	pCM188	Este trabalho
pCM188-MET3-HsDHS	DHS de <i>H. sapiens</i> sob controle de MET3pr	pCM188-MET3	Este trabalho
pCM188-LmDHSc	DHSc (catalítica) de <i>L. major</i>	pCM188	Este trabalho

pCM188-LmDHSp	DHSp (proenzima) de <i>L. major</i>	pCM188	Este trabalho
pCM188-LmDHSc/ LmDHSp	DHSp + DHSc de <i>L. major</i> + ERBV	pCM188	Este trabalho
pCM188-MET3-LmDHSc/ LmDHSp	DHSp + DHSc de <i>L. major</i> + ERBV sob controle de MET3pr	pCM188-MET3	Este trabalho
pCM188-PvDHS	DHS de <i>P. vivax</i>	pCM188	Este trabalho
pCM188-MET3-PvDHS	DHS de <i>P. vivax</i> sob controle de MET3pr	pCM188-MET3	Este trabalho
pCM188-BmDHS	DHS de <i>B. malayi</i>	pCM188	Este trabalho

Tabela 2. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas nesse trabalho

Nome	Genótipo ¹	Fonte
HA_SC_1352control	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pdr1Δ::NatMX pdr3Δ::MET17 snq2Δ::KI.LEU2</i>	Hanna Alalam (ALALAM et al., 2021)
SFS01	HA_SC_1352control - <i>can1::mCherry</i>	Obtida nesse trabalho
SFS02	HA_SC_1352control - <i>can1::Sapphire</i>	Obtida nesse trabalho
SFS03	HA_SC_1352control - <i>can1::Venus</i>	Obtida nesse trabalho
SFS04	SFS02 - <i>dys1Δ::MET3pr-HsDHS</i>	Obtida nesse trabalho
SFS05	SFS01 - <i>dys1Δ::MET3pr-PvDHS</i>	Obtida nesse trabalho
SFS06	SFS03 - <i>dys1Δ::pPGK1-LmDHSc-tCYC1/pTEF1-LmDHSp-tADH1</i>	Obtida nesse trabalho
VZL1444	<i>MATα / MATα can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 / CAN1 lyp1Δ / LYP1 HYP2::natMX4 / HYP2 pdr5Δ::kanMX / PDR5 dys1Δ::HIS3 / DYS1 leu2Δ0 / leu2Δ0 his3Δ1 / his3Δ1 ura3Δ0 / ura3Δ0 met15Δ0 / met15Δ0</i>	Obtida nesse trabalho

VZL1462	<i>MAT_a can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ pdr5Δ::kanMX ura3Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i>	Obtida nesse trabalho
VZL1474	<i>MAT_a can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ pdr5Δ::kanMX dys1Δ::HIS3 ura3Δ0 his3Δ1 met15Δ0 [pCM188-LmDHSc-ERBV-LmDHSp/URA]</i>	Obtida nesse trabalho
VZL1464	<i>MAT_a can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ pdr5Δ::kanMX dys1Δ::HIS3 ura3Δ0 his3Δ1 met15Δ0 [pCM188-HsDHS]</i>	Obtida nesse trabalho (SILVA et al., 2020)
VZL1472	<i>MAT_a can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ pdr5Δ::kanMX dys1Δ::HIS3 ura3Δ0 his3Δ1 met15Δ0 [pCM188-PvDHS]</i>	Obtida nesse trabalho
VZL1400	<i>MAT_a can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ pdr5Δ::kanMX dys1Δ::HIS3 ura3Δ his3Δ met15Δ [pCM188-BmDHS]</i>	Obtida nesse trabalho

¹ *STE2pr-LEU2* corresponde ao gene selvagem *LEU2* de *S. cerevisiae*, controlado pelo promotor do gene *STE2* de *S. cerevisiae*, que é ativo apenas em linhagens do tipo *MAT_a*. *hphMX* corresponde ao cassete contendo o gene *hph* de *Klebsiella pneumonia*, que confere resistência para o antibiótico higromicina B em *S. cerevisiae*; *natMX4* corresponde ao cassete contendo o gene *nat1* de *Streptomyces noursei*, que confere resistência para o antibiótico nourseotricina. *kanMX* contém o gene *kan* do transposon Tn903 de *Escherichia coli*, que confere resistência a G418 (geneticina) em *S. cerevisiae*.

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência	Finalidade
HsDHS F	GGCGGATCCATGCATCATCACCATCACCAC ATGGAAGGTTCTTTGGAAAGGGAAG	Amplificação para clonagem em pCM188
HsDHS R	CGCTGCAGTCAGTCCTCGTTCTTTTCGTGC	Amplificação para clonagem em pCM188
BmDHS F	CGCGGATCCATGCATCATCACCATCACCACA TGGACAACGGTAACTGTAAATTCGATGTTC	Amplificação para clonagem em pCM188
BmDHS R	GACTGCAGTCAGGCTTCTTGCAATTCGGA	Amplificação para clonagem em pCM188

PvDHS F	CGCGGATCCATGCATCATCACCATCACCACA TGACTAATCAAGGTGCCTTCAAAGAAGTTAA CA	Amplificação para clonagem em pCM188
PvDHS R	GACTGCAGTCACCTCAATTGTGCTTCACCAG	Amplificação para clonagem em pCM188
LmDHSc F	GAGGGATCCATGCATCATCACCATCACCACA TGCGGAATATTGCGGAGTC	Amplificação para clonagem em pCM188
LmDHSc R	GGAGCGGCCGCTCATTCTCCACGACACAGG TGAG	Amplificação para clonagem em pCM188
LmDHSp F	GACGGATCCATGCATCATCACCATCACCACA TGCTTGCCTCTGCCCCAG	Amplificação para clonagem em pCM188
LmDHSp R	CTTGAGCTCTTACGCTGCAGCCCCCTCCAG	Amplificação para clonagem em pCM188
LmDHSc R - ERBV	ACCAGCCAATTTCAACAAAGAAAATTAGTA GCACCACCAGAACCTTCTCCACGACACAGG TGAGAGTG	Amplificação para clonagem em pCM188
LmDHSp F - ERBV	TCTTTGTTGAAATTGGCTGGT GATGTTGAAT TGAATCCAGGTCCAATGCATCATCACCATCA CCACATGCTTGCCTCTGCCCCAG	Amplificação para clonagem em pCM188
pCM F	CGTAGGTGAACTGATTGAGAAAAAT	Sequenciamento de DNA
CYC1t R	GGCGTGAATGTAAGCGTGAC	Sequenciamento de DNA
DYS1_A	GGAATGTACACATTTCAAATTAGGG	Confirmação da deleção de <i>DYS1</i>
DYS1_D	CGTAGGTGAACTGATTGAGAAAAAT	Confirmação da deleção de <i>DYS1</i>
PDR5 F	GCCTCTTTGTTGTTTACAATGTCTT	Confirmação da deleção de <i>PDR5</i>
PDR5 R	TCACACTAAATGCTGATGCCTATAA	Confirmação da deleção de <i>PDR5</i>
sgRNA CAN1 F	GACTTTGATACGTTCTCTATGGAGGA	RNA guia <i>locus</i> <i>CAN1</i>
sgRNA CAN1 R	AAACTCCTCCATAGAGAACGTATCAA	RNA guia <i>locus</i> <i>CAN1</i>
sgRNA DYS1 F	GACTTTACGAATCCTCCGTATTGTAC	RNA guia <i>locus</i> <i>DYS1</i>
sgRNA DYS1 R	AAACGTACAATACGGAGGATTCGT	RNA guia <i>locus</i> <i>DYS1</i>
dys1-tADH1 Repair 3 F	GCTTAGTTAACTTATATACAAGTCAAAGCAAA AAAGATGTCCGATATCAACGcctaggaattggagc gacctcatg	Amplificação para reparo por homologia <i>locus</i> de <i>DYS1</i>
dys1-MET3p Repair 3 F	GCTTAGTTAACTTATATACAAGTCAAAGCAAA AAAGATGTCCGATATCAACGcttagtactaacaga gactttgtcac	Amplificação para reparo por homologia <i>locus</i> de <i>DYS1</i>

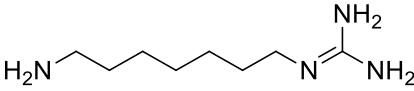
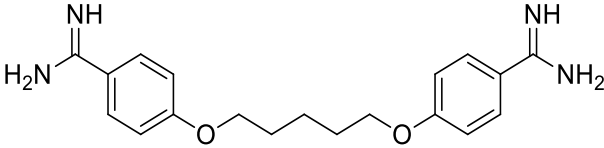
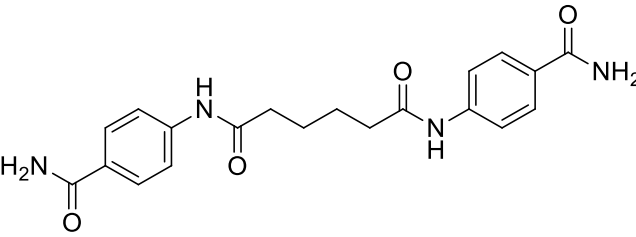
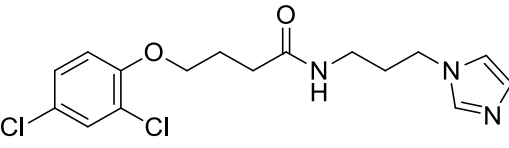
dys1-tCYC Repair 3 R	CTCTCATCAATTCTTAACCTTTTTTGATTGGTT TACCACTGGCAAAGGTAGCAGCAACcttcgagc gtcccaaaaccttctc	Amplificação para reparo por homologia <i>locus</i> de <i>DYS1</i>
Dys1 F	TCGTGTTTTGCTTAGTTAACTTATATACAA	Sequenciamento (<i>locus DYS1</i>)

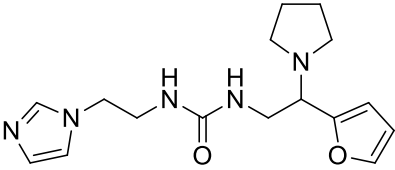
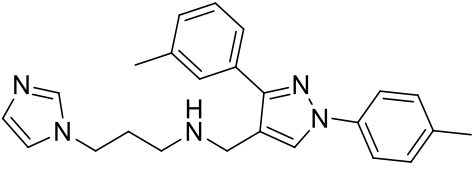
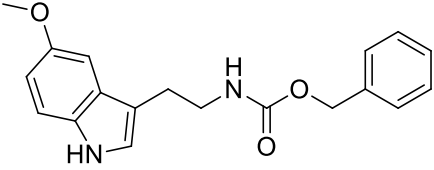
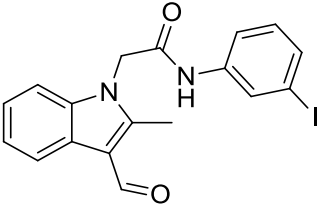
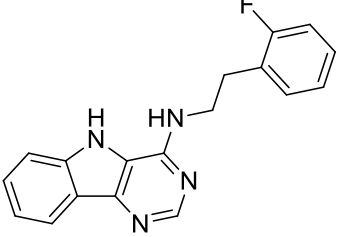
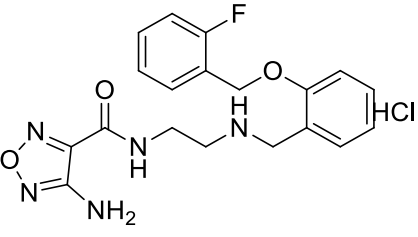
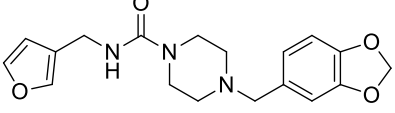
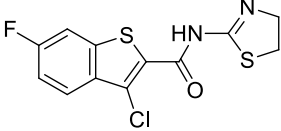
Os nucleotídeos destacados em negrito se sobrepõem para fusão dos fragmentos amplificados.

Compostos químicos testados

Inicialmente, o inibidor de DHS, GC7 e mais nove novos compostos químicos foram adquiridos de diferentes fornecedores (Tabela 4). Estoque dos compostos foram preparados em DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma) a uma concentração de 50 mM e armazenados a -20° C. Adicionalmente, 400 compostos da coleção *Pathogen box* (*Medicines for Malaria Venture*), que estavam disponíveis no laboratório do Prof. Dr. Per Sunnerhagen, Universidade de Gotemburgo, Suécia, foram testados. Os estoques desses compostos estavam a uma concentração de 10 mM em DMSO (Sigma), armazenados a -80° C. Novos lotes de dois compostos (Tabela 4) dessa coleção foram adquiridos para testes confirmatórios.

Tabela 4. Compostos químicos testados neste trabalho.

ID do composto	Estrutura 2D	Fornecedor
GC7		Merck
GNF-Pf-3680		Apexbio Technology LLC
CHEMBL1081521		ChemBridge Corporation
GNF-Pf-744		ChemBridge Corporation

CHEMBL3493253		ENAMINE Ltd.
TCMDC-124630		ChemBridge Corporation
ZINC518875		InterBioScreen Ltd.
GNF-Pf-4241		ChemBridge Corporation
GNF-Pf-3738		InterBioScreen Ltd.
CHEMBL1305755		Vitas-M Laboratory, Ltd.
MMV688553		ChemBridge Corporation
MMV676584		ChemBridge Corporation

3.1. Triagem *in silico* (virtual) da coleção de moléculas ChEMBL-NTDs utilizando ancoragem molecular

O modelo molecular por homologia das proteínas DHS de *L. major* e *P. vivax* foram gerados através do software YASARA (LAND; HUMBLE, 2018). Para a proteína DHS de *H. sapiens* já existem estruturas cristalográficas disponíveis e as triagens *in silico* foram realizadas no modelo 6P4V (WAȦTOR; WILK; GRUDNIK, 2020). As estruturas 3D das proteínas foram preparadas para o *docking* usando a plataforma *Protein Preparation Wizard* (Schrödinger Release 2021-2: Schrödinger Suite 2021-2 Protein Preparation Wizard) (MADHAVI SASTRY et al., 2013) do software Maestro (Schrödinger Release 2021-2: Maestro, NY, 2021); as moléculas de água e os ligantes, com exceção do cofator NAD⁺ que estará presente nos ensaios enzimáticos, foram removidos. Foram adicionados hidrogênios e, por fim, as estruturas foram submetidas a refinamentos geométricos usando o campo de força OPLS4. Já as estruturas no formato sdf das moléculas das coleções do repositório da ChEMBL-NTD foram preparadas usando o campo de força OPLS4, possíveis estados de ionização e protonação foram atribuídos usando o pH 7,0 (Schrödinger Release 2021-2: Schrödinger Suite 2021-2, LigPrep) (MADHAVI SASTRY et al., 2013). A ancoragem molecular (*docking*) dos compostos nas estruturas preparadas ocorreu mediante informação das coordenadas correspondentes aos aminoácidos do sítio de interação com o ligante GC7 (WAȦTOR; WILK; GRUDNIK, 2020). O *docking* foi realizado na plataforma *Virtual Screening Workflow* (Schrödinger Release 2021-2: Schrödinger Suite 2021-2, Virtual Screening Workflow Glide) (FRIESNER et al., 2004), em quatro etapas: seleção de 10% das melhores poses obtidas por *Glide HTVS* (*high-throughput virtual screening*); seleção de 10% das melhores poses obtidas por *Glide SP* (*standard precision*); seleção de 10% das melhores poses obtidas por *Glide XP* (*extra precision*); pós-processamento usando *Prime MM-GBSA* (WICHAPONG et al., 2014). Essa etapa do trabalho foi executada em colaboração com o Prof. Dr. Leif Eriksson e o aluno Sayyed Jalil Mahdizadeh (Universidade de Gotemburgo, Suécia).

3.2. Geração da primeira versão da plataforma de *S. cerevisiae* com substituição da DHS endógena pelas enzimas DHS dos organismos patogênicos

3.2.1. Clonagem das DHSs dos patógenos eucariotos no vetor de expressão em *S. cerevisiae*

O primeiro sistema de linhagens gerado nesse projeto se baseou em metodologia publicada previamente (BILSLAND et al., 2016; SILVA et al., 2020). As sequências codificantes da DHS de *H. sapiens* (Gene ID: 1725, isoforma A, aqui referido como HsDHS), *P. vivax* (Gene ID: 5476136; aqui referido como PvDHS) e *B. malayi* (Gene ID: 6098167; aqui referido como BmDHS) foram amplificadas por PCR a partir de um molde de DNA plasmidial, usando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3, e foram clonadas nos sítios *Bam*HI-*Pst*II de pCM188 (Tabela 1) para produzir pCM188-HsDHS, pCM188-PvDHS e pCM188-BmDHS, respectivamente (Tabela 1). As regiões codificantes das duas isoformas da DHS de *L. major*, DHS34 (Gene ID: 5654787; aqui referido como LmDHSc) e LMJF_20_0250 (Gene ID: 56513010; aqui referido como LmDHSp) foram amplificadas por PCR a partir do molde de DNA plasmidial e clonadas nos sítios *Bam*HI-*Not*I de pCM188 (Tabela 1) para produzir pCM188-LmDHSc e pCM188-LmDHSp, respectivamente. Por fim, as duas isoformas, LmDHSc e LmDHSp, foram amplificadas em um único fragmento fusionadas pelo peptídeo viral 2A de *skipping* da tradução (aminoácidos 1097 até 1116) de ERBV-1 (Equine rhinitis B virus 1), através de PCR de sobreposição. Para isso o códon de parada da primeira isoforma ordenada no fragmento, LmDHSc, foi removido e foram utilizados oligonucleotídeos contendo sobreposições de 21 nucleotídeos da sequência de ERBV-1 (Tabela 3). A PCR de sobreposição foi realizada conforme descrito em protocolo padronizado em estudos anteriores (HILGARTH; LANIGAN, 2020). Apesar de as isoformas terem sido fusionadas, o peptídeo 2A entre as sequências codificantes promove uma recodificação ribossomal (*skipping* da tradução) (SOUZA-MOREIRA et al., 2018a) e são traduzidas duas proteínas, LmDHSp e LmDHSc. O fragmento amplificado foi clonado nos sítios *Bam*HI-*Not*I do vetor pCM188 (Tabela 1) para produzir pCM188-LmDHSp/LmDHSc (Tabela 1). As clonagens foram confirmadas por PCR de colônia e sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

3.2.2. Transformação e seleção do haploide

Para gerar as linhagens de *S. cerevisiae* complementadas com enzimas DHS ortólogas, a transformação das construções (pCM188-HsDHS, pCM188-PvDHS, pCM188-BmDHS, pCM188-LmDHSc, pCM188-LmDHSp ou pCM188-LmDHSp/LmDHSc, Tabela 1) foi realizada em uma linhagem heterozigota para a deleção do gene de levedura *DYS1* (codifica DHS de *S. cerevisiae*, aqui referido como ScDHS) e heterozigota para *PDR5* (*pdr5Δ::kanMX*). *PDR5* é um gene que codifica para um transportador de membrana da família ABC (*ATP-binding cassette*) e seu nocaute é útil para triagens de drogas (BILSLAND et al., 2016a). Após a transformação, estas linhagens heterozigotas que abrigavam as construções heterólogas foram submetidas ao processo de esporulação e os haplóides derivados foram selecionados. Resumidamente, as construções citadas no parágrafo acima foram transformadas utilizando a linhagem diplóide VZL1444 (Tabela 2). Esta linhagem diplóide possui um nocaute de ScDHS (*DYS1*), substituído pela inserção do marcador genético HIS3 (*dys1Δ::HIS3*), servindo assim como um marcador de seleção positivo, uma vez que a linhagem crescerá em meios sem histidina. A linhagem deve ser diplóide, considerando que o gene *DYS1* é essencial em *S. cerevisiae*, necessitando de um alelo selvagem para sua viabilidade. Essa linhagem também possui outros genes que podem ser utilizados para a seleção de haplóides (marcadores recessivos), após a transformação e esporulação: genes *CAN1* e *LYP1*. *CAN1* e *LYP1* codificam, respectivamente, permeases de membrana plasmática de arginina e lisina e suas deleções conferem resistência à canavanina e a tialisina, respectivamente. A linhagem query também possui o repórter STE2pr-LEU2, que promove a expressão do gene *LEU2* apenas em haplóides do *mating type* tipo a (*MATa*) (TONG et al., 2001). As deleções de *DYS1* e *PDR5* foram confirmadas por PCR de colônia (CHU, 2017).

3.2.3. Ensaio de diluição seriada de levedura

As linhagens foram cultivadas em 5 mL de meio seletivo adequado a 30° C até atingir aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células / mL. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 3.000 xg por 7 min e ressuspensas até a concentração final de $2,5 \times 10^8$ células / mL. Após esse procedimento, 100 µL dessa suspensão foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e foram realizadas 5 diluições seriadas

de dez vezes. Um volume de 4 µL da suspensão original e das diluições foram aplicadas nos meios de interesse. As placas foram então incubadas a 30° C por 3 dias. Esse experimento foi conduzido em triplicata compreendendo três experimentos independentes.

3.2.4. **Western Blot para checagem da complementação funcional**

Para verificar a ocorrência de hipusinação, as linhagens foram cultivadas *overnight* e depois diluídas para 0,1 (D.O._{600nm}) e crescidas até a fase exponencial a 30° C em 5 mL de cultura. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação a 4° C e armazenadas a - 80° C. Os precipitados de células foram ressuspensos em 100 µL de tampão de lise (200 mM de Tris / HCl, pH 7,0; 2 mM de DTT; 2 mM de EDTA; 2 mM de PMSF e 5 µg / mL de pepstatina, leupeptina, aprotinina e quimostatina) e lisadas por agitação em FastPrep (três ciclos de agitação de 20 s) com *beads* de vidro. As células foram clarificadas por centrifugação a 20.000 ×g por 15 min a 4° C e o sobrenadante foi coletado. A quantificação da proteína foi realizada utilizando o ensaio de proteína DC (BioRad) contra uma curva de calibração de albumina de soro bovino (BSA; Sigma Aldrich). Uma quantidade de 7,5 µg de proteína total foi aplicada em um gel de SDS-PAGE 12% e transferida para membrana de nitrocelulose por um sistema de transferência semi-seco (Bio Rad, número de catálogo 1704150), seguindo o protocolo padrão desse equipamento.

A imunotransferência foi realizada usando os seguintes anticorpos: anticorpo policlonal de coelho anti-eIF5A (levedura) (ROSSI et al., 2016) a uma diluição de 1:10.000; anticorpo policlonal de coelho anti-hipusina (Millipore) a uma diluição de 1:2.000; e um anticorpo policlonal de coelho anti-Rpl5 (levedura) a uma diluição de 1:25.000 (controle de carregamento) (ROSSI et al., 2016) seguido por anticorpo secundário anti-coelho a uma diluição de 1:20.000 (Sigma Aldrich). As proteínas de interesse foram detectadas usando um sistema de detecção de quimioluminescência (ECL, GE Healthcare) em *C-Digit Blot Scanner*.

3.2.5. **Ensaio de curva de crescimento das linhagens complementadas na presença do composto GC7**

O crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* contendo a DHS endógena substituída, na presença ou ausência do inibidor de DHS de mamífero, N1-guanil-1,7-

diamino-heptano (GC7) (JAKUS et al., 1993), foi monitorado por curva de crescimento por densidade óptica. Cada linhagem foi cultivada a 30° C em 5 mL de meio de cultura até atingir a fase estacionária. Após este processo, as linhagens foram diluídas em meio seletivo para uma densidade óptica (D.O._{600nm}) inicial de 0,2 (aproximadamente 1×10^6 células / mL). Um volume final de 150 µL das células diluídas acrescidas de 1 mM de GC7, 0,1 mM de ácido acético (veículo medicamentoso) e 1 mM de aminoguanidina (condição tratada com GC7) ou 1 mM de aminoguanidina e 0,1 mM de ácido acético (condição não tratada) foram transferidos, em triplicata, para uma microplaca de fundo plano de 96 poços (SPL - código 004393). Adicionou-se aminoguanidina ao meio para evitar a degradação do GC7 por amina oxidases (PARK et al., 1994).

Os valores de absorbância (D.O._{600nm}) foram obtidos a cada 15 minutos em um período total de 15 h pelo leitor de placas Infinite 200 Pro (TECAN) e os dados foram normalizados subtraindo o valor de D.O._{600nm} obtido, para a condição tratada com GC7 ou não tratada, pelos valores do *background* da absorbância (meio mais compostos). Esses dados normalizados foram convertidos em média móvel simples, usando quatro pontos, e esses valores foram usados para análise usando o pacote Grofit disponível no software R, com base no método de *model-free spline* (KAHM et al., 2010). O método de análise *smoothed spline* foi selecionado e os *scores* de crescimento foram obtidos calculando a taxa de crescimento máxima para cada cultura. Um *score* para cada linhagem foi determinado calculando a taxa máxima de crescimento exponencial para cada réplica multiplicada pelo rendimento celular máximo da réplica e, em seguida, dividindo esse resultado pela duração da fase lag. Finalmente, um *score* relativo para cada cepa foi determinado pelo quociente do *score* obtido para a condição tratada e o *score* obtido para a condição não tratada. Um teste t-Student ($p < 0,05$) foi usado para avaliar as diferenças no *score* de crescimento para linhagens individuais na presença ou ausência de GC7. As diferenças nos *scores* de crescimento entre as linhagens foram avaliadas por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3. Geração da segunda versão da plataforma de substituição da DHS em *S. cerevisiae* para teste de inibidores

Em colaboração com o Prof. Dr. Per Sunnerhagen (Universidade de Gotemburgo, Suécia), foi desenvolvida uma segunda versão da plataforma de

substituição em levedura, utilizando metodologias previamente descritas para CRISPR/Cas9 (DICARLO et al., 2013; RYAN et al., 2014) para gerar linhagens de *S. cerevisiae* com duas modificações principais: integração cromossômica das sequências codificantes para as proteínas fluorescentes *mCherry* e *Sapphire*; e substituição do gene essencial *DYS1* (codifica DHS em *S. cerevisiae*) por genes DHS dos patógenos de interesse e de humano, integrados no genoma da linhagem de trabalho de *S. cerevisiae*.

O *background* genético para a geração das linhagens expressando DHS de *H. sapiens* e *P. vivax* foi a linhagem de *S. cerevisiae* HA_SC_1352control (ALALAM et al., 2021) (Tabela 2), que possui deleção de *PDR1* e *PDR3*, fatores de transcrição que regulam resposta pleiotrópica a droga, e de *SNQ2*, transportador de membrana da família ABC, o que aumenta o número de compostos apresentando resposta bioativa à levedura (PIOTROWSKI et al., 2017).

3.3.1. Integração das proteínas fluorescentes *mCherry*, *Sapphire* e *Venus*

As sequências codificantes para as proteínas fluorescentes *Sapphire* e *mCherry* foram inseridas por reparo dirigido por homologia, sob controle do promotor constitutivo *TDH3*, no *locus* de *CAN1* (DICARLO et al., 2013).

3.3.1.1. Desenho, montagem e preparo do sgRNA

As etapas de desenho, montagem e preparo do sgRNA para o *locus* de *CAN1* foram adaptadas da plataforma Benchling (<<https://benchling.com/pub/ellis-crispr-tools>>). Uma sequência guia para a quebra da dupla fita de DNA no *locus* de *CAN1* já havia sido reportada e foi selecionada para montagem do plasmídeo contendo sgRNA (DICARLO et al., 2013). Essa sequência de oligonucleotídeos (Tabela 3) foi adquirida (Sigma) e, após anelamento dos oligonucleotídeos, foi clonada no sítio *BsmBI* do sgRNA *entry vector* pWS082 (Tabela 1) usando *Golden gate assembly* (MARILLONNET; GRÜTZNER, 2020), substituindo assim a sequência codificante de GFP de pWS082 e gerando a construção pWS082-CAN1 sgRNA (Tabela 1). Metade da reação foi utilizada para transformação em *E. coli* 10-betaTM (NEB). Colônias brancas (ausência de GFP) foram selecionadas, o plasmídeo pWS082-CAN1 sgRNA

(Tabela 1) foi extraído utilizando o kit *GeneJet Plasmid miniprep* (ThermoFisher Scientific) e a clonagem foi confirmada por sequenciamento de DNA.

3.3.1.2. Transformação

O cassete de expressão de *CAN1* sgRNA, presente em pWS082-CAN1 sgRNA (Tabela 1), foi linearizado por digestão com a enzima de restrição *EcoRV* a 37° C por 1 hora. Esse fragmento gerado possui 500 pb homólogos ao plasmídeo que contem Cas9, pWS172 (Tabela 1). O plasmídeo pWS172 foi digerido com *BsmBI* (42° C – 45 minutos; 60° C – 15 minutos e 80° C – 20 minutos) e o fragmento linear gerado foi purificado a partir do gel de agarose (1,2%), utilizando o kit *GeneJet Gel Extraction* (ThermoFisher Scientific). Em um sistema de levedura esses fragmentos lineares irão reconstituir um vetor de expressão Cas9-sgRNA estável.

As sequencias de *mCherry*, *Sapphire* e *Venus* foram amplificadas por *touchdown* PCR a partir de um molde de DNA plasmidial, com a adição de aproximadamente 50 pb homólogos ao *locus* de *CAN1* em 5' e 3' inseridos nos oligonucleotídeos (Tabela 3). O produto de PCR foi purificado utilizando o kit para purificação de PCR *PureLink™* (ThermoFisher Scientific).

Os fragmentos lineares nas seguintes concentrações: 100 ng de Cas9 (pWS172 digerido); 300 ng de *CAN1*-sgRNA (pWS082-CAN1-sgRNA digerido) e 3 µg dos produtos de PCR, foram transformados na levedura HA_SC_1352control (ALALAM et al., 2021) (Tabela 2), seguindo protocolo padrão de transformação de super-alta eficiência de levedura (adaptado da plataforma online *Benchling*), gerando as linhagens SFS01, SFS02 e SFS03 (Tabela 2). Foram realizadas também transformações adicionando água ao invés dos produtos de PCR como controle. As confirmações das inserções foram realizadas por PCR de colônia e sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

3.3.2. Deleção de *DYS1* e integração de DHSs de *H. sapiens*, *P. vivax* e *L. major*

3.3.2.1. Clonagem dos genes DHS em plasmídeo pCM188-MET3 e amplificação de DHS por PCR

Os genes DHS de *H. sapiens*, *P. vivax* e *L. major* presentes nas construções pCM188-HsDHS, pCM188-PvDHS e pCM188-LmDHSp/LmDHSc (Tabela 1) foram subclonados nos sítios *Bam*HI e *Pst*II do plasmídeo pCM188-MET3 (Tabela 1), gerando pCM188-MET3-HsDHS, pCM188-MET3-PvDHS e pCM188-MET3-LmDHS (Tabela 1). Dessa forma DHS foi expresso sob controle do promotor do gene *MET3* (*MET3pr*), que por sua vez é fortemente regulado pela adição de metionina no meio de cultura (MAO et al., 2002).

As sequências codificantes para *MET3pr* seguido pelas DHS de *H. sapiens* ou *P. vivax* ou *L. major*, foram amplificadas com adição de aproximadamente 50 nucleotídeos homólogos à sequência codificante de *DYS1* em 5' (sendo eles *upstream* a posição 16 da ORF) e 3' (sendo eles *downstream* a posição 1132 da ORF de *DYS1*) (oligonucleotídeos descritos na Tabela 3), por PCR *touchdown* seguindo protocolos padrões da *Phusion*TM Polimerase (*ThermoFisher Scientific*). Para LmDHS, um produto de PCR extra foi gerado: contendo os nucleotídeos homólogos ao *locus* de *DYS1* mais os genes LmDHS controlados pelos promotores constitutivos fortes, pPGK1-LmDHSc-tCYC1/pTEF1-LmDHSp-tADH1. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit para purificação de PCR *PureLink*TM (*ThermoFisher Scientific*).

3.3.2.2. Transformação

Os mesmos protocolos utilizados para *CAN1*, descritos acima (Tópicos 3.3.1.1. e 3.3.1.2. em Material e Métodos), foram adaptados para desenho, montagem, preparo de *DYS1* sgRNA e transformação, mas usando o plasmídeo pWS158 (Tabela 1) e pelo menos 5 µg dos produtos de PCR na transformação. Os fragmentos lineares foram transformados nas linhagens SFS01, SFS02 e SFS03 (Tabela 2), gerando as linhagens SFS05, SFS04 e SFS06 (Tabela 2), respectivamente. As confirmações das integrações no genoma foram realizadas por PCR de colônia utilizando um primer *forward* anelando *upstream* ao *locus* de *DYS1* e um primer anelando na CDS do novo

gene inserido (Tabela 3) (AKHMETOV et al., 2018), e sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

3.4. Rastreamento de inibidores das DHS de *L. major* e *P. vivax* utilizando ensaio em *S. cerevisiae*

3.4.1. Condições de cultura

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 2. Meio de cultura SC (*Synthetic complete medium*) (0,19% de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos e sulfato de amônio; 0,5% de sulfato de amônio; 2% de glicose) com o *drop-out* de aminoácidos apropriado foi utilizado para manutenção das linhagens. As culturas líquidas foram cultivadas em *shaker* a 30° C sob agitação.

3.4.2. Validação da plataforma utilizando ensaios fenotípicos em Bioscreen

As linhagens complementadas pelas DHS de *H. sapiens* (Linhagem SFS04, Tabela 2), *L. major* (VZL1474, Tabela 2) e *P. vivax* (Linhagem SFS05, Tabela 2) foram analisadas quanto ao seu crescimento, mediante ensaio de curva de crescimento por absorbância. Ressaltando que para LmDHS, a ausência da redução da expressão de DHS (SFS06, Tabela 2) impossibilitou a visualização da redução de crescimento da linhagem por compostos e a linhagem contendo LmDHS expresso em um plasmídeo regulado por tetraciclina (VZL1474, Tabela 2) foi utilizada para esse ensaio. Antes de iniciar o teste da inibição dos compostos, foi realizada uma padronização inicial do ensaio usando o conhecido inibidor da enzima DHS de humano, GC7 (JAKUS et al., 1993; LIU et al., 2021). As linhagens complementadas pelas DHS de *H. sapiens* e *P. vivax* (SFS04 e SFS04, respectivamente, Tabela 2) foram cultivadas em meio SC e testadas quanto a diferentes concentrações de metionina para avaliar a inibição por GC7 mediante diferentes níveis de expressão da proteína. A linhagem complementada pela DHS de *L. major* (VZL1474, Tabela 2) foi cultivada em meio SC na ausência de arginina, lisina, histidina e uracila, e contendo os antibióticos 50 µg/mL de canavanina, 50 µg/mL de tialisina e 300 µg/mL de G418 e, adicionalmente, diferentes concentrações de doxicilina, para regular a expressão de DHS.

Uma pré-cultura de 5 mL foi crescida a 30° C sob agitação até aproximadamente 1×10^7 células/mL. Após atingir tal crescimento, as pré culturas foram diluídas para uma concentração de aproximadamente 1×10^6 células/mL (D.O._{600nm} = 0,2) e as culturas foram mantidas em incubadora sob agitação por aproximadamente 3 horas, até atingirem fase exponencial de crescimento (D.O._{600nm} ~ 0,6).

Logo antes de iniciar o experimento, as culturas foram centrifugadas (11.200 xg, 5 minutos) e o *pellet* ressuspendido em volume apropriado para atingir uma D.O._{600nm} de 1,0. As culturas foram diluídas a uma D.O._{600nm} de 0,1 em meio SC apropriado e aliquotadas em um volume final de 100 µL/poço em placa de 100 poços (*Honeycomb plates, Labsystems Oy*) usando o pipetador automatizado *OT2 robot (Opentrons)*. As linhagens foram cultivadas por 3 dias em baixa agitação e os valores de absorbância (D.O._{450–600nm}) foram mensurados a cada 20 minutos no equipamento *Bioscreen C plate reader (Oy Growth Curves Ab Ltd)*.

3.4.3. Ensaios fenotípicos robotizados

As linhagens foram cultivadas em meio líquido descrito acima, utilizando as concentrações ideais de metionina ou doxíciclina selecionadas pelo ensaio de absorbância em *Bioscreen*.

Antes de iniciar o experimento, as culturas a uma D.O._{600nm} final de 0,1 foram distribuídas em placas pretas de 384 poços (Greiner) usando *Thermo Combi Multidrop*. Os compostos (Tabela 3) foram transferidos para as placas usando a plataforma *Bravo Liquid Handling* a uma concentração final de 25 a 200 µM para cada composto (concentração final de DMSO a 1,25%) em um volume final de 80 µL. As culturas foram incubadas a 30° C e seu crescimento monitorado como descrito previamente (BILSLAND et al., 2013). Uma plataforma automatizada foi programada para ciclos de incubação, agitação e leitura das placas usando o robot Eve (BILSLAND et al., 2013). Os valores de fluorescência (*mCherry* = 580 nm excitação/ 612 nm emissão; *Sapphire* = 400 nm excitação/ 511 nm emissão) e absorbância (D.O._{600nm}) foram mensuradas a cada 20 minutos por 3 dias no leitor de placas BMG *Polarstar*. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas, além de os ensaios serem repetidos pelo menos duas vezes.

Para analisar a redução de crescimento visualmente, as curvas de crescimento foram plotadas usando a média dos valores absolutos de fluorescência (UAF) ou absorbância ($D.O._{600nm}$) $\pm$ o desvio padrão de quadruplicados e a amostra de controle do solvente no mesmo gráfico como referência. Um modelo foi ajustado, considerando as equações modelo para crescimento logístico onde há um crescimento exponencial seguido de redução no crescimento até que ocorra a estabilização do tamanho da população, para as mensurações dos parâmetros relativos às curvas usando o pacote Growthcurver (SPROUFFSKE; WAGNER, 2016) no software R studio (Versão 2022 12.0 para Windows, Posit Software), e os valores de área sob a curva (AUC) foram extraídos para cada curva. Foram realizados testes-t Student de quatro amostras comparando cada composto com o controle de solvente e chegando a um valor final de crescimento relativo a partir dessa comparação (crescimento relativo = AUC composto / AUC DMSO).

Os 400 compostos da coleção *Pathogen box* também foram testados na linhagem complementada por PvDHS de acordo com esta mesma metodologia, no entanto o experimento foi realizado em quadruplicata, sem repetição do ensaio. As curvas foram plotadas representando as médias, no software R. Dois candidatos obtidos por esse rastreamento foram adquiridos para confirmação dos resultados (Tabela 4).

3.4.4. Avaliação da taxa de hipusinação das linhagens tratadas com metionina ou compostos químicos

Para analisar a taxa de hipusinação das linhagens complementadas, tratadas com diferentes concentrações de metionina (redução da expressão de DHS) ou com candidatos a inibidores, foi realizado um ensaio de *western blot*. Esse experimento foi realizado de acordo com o protocolo descrito no tópico 3.2.4 (*Western Blot* para checagem da complementação funcional), com algumas modificações. As linhagens foram cultivadas por aproximadamente 14 horas em meio SC na ausência de metionina. As pré-culturas foram diluídas para uma densidade óptica ($D.O._{600nm}$) de 0,15 e crescidas por 10 horas em um novo meio SC com diferentes concentrações de metionina. As células foram coletadas por centrifugação a 4° C e armazenadas a - 80° C.

Para os ensaios com inibidores, após 10 horas de crescimento celular com meio SC na concentração selecionada de metionina, as células foram lavadas e novamente diluídas à uma D.O._{600nm} de 0,15 em meio SC na ausência de metionina; os candidatos a inibidores foram adicionados a uma concentração de 100 µM, com exceção dos compostos GC7 (controle de inibição) e GNf-Pf-3738, que foram adicionados a uma concentração de 50 µM. Um controle para 0% de inibição também foi preparado, contendo apenas células e o veículo DMSO. Após 12 horas de tratamento, as células foram coletadas por centrifugação a 4° C e armazenadas a -80° C. Os precipitados de células foram ressuspensos em 40 µL de tampão de lise (200 mM de Tris / HCl, pH 7,0; 2 mM de DTT; 2 mM de EDTA; 2 mM de PMSF) e lisadas no agitador para tubos durante 10 minutos com *beads* de vidro. As células foram clarificadas por centrifugação a 20.000 xg por 15 min a 4° C e o sobrenadante foi coletado. A quantificação da proteína foi realizada utilizando o ensaio de quantificação de proteína BCA (QPro BCA kit, Cyanagen) contra uma curva de calibração de albumina de soro bovino (BSA; Sigma Aldrich). Uma quantidade de 12 µg de proteína total foi aplicada em um gel de SDS-PAGE 12% e transferida para membrana de nitrocelulose por um sistema de transferência semi-seco (Bio Rad, número de catálogo 1704150), seguindo o protocolo padrão desse equipamento.

A imunotransferência foi realizada usando os seguintes anticorpos: anticorpo policlonal de coelho anti-eIF5A (levedura) a uma diluição de 1:10.000; anticorpo policlonal de coelho anti-hipusina (Millipore) a uma diluição de 1:2.000; e um anticorpo policlonal de coelho eEF2 (levedura) a uma diluição de 1:25.000 (controle de carregamento da amostra) (ThermoFisher) seguido por anticorpo secundário anti-coelho a uma diluição de 1:20.000 (Sigma Aldrich). As proteínas de interesse foram detectadas usando um sistema de detecção de quimioluminescência (ECL, Amershan) em fotodocumentador Uvitec (Alliance). As bandas detectadas no *western blot* foram quantificadas utilizando o software *GelAnalyzer* 19.1 (ISTVAN LAZAR, [s.d.]). As bandas detectadas para anti-eIF5A e anti-hipusina foram normalizadas pelo controle de carregamento (anti-eEF2) e a taxa de hipusinação foi calculada dividindo os valores obtidos para eIF5A hipusinada pelos valores quantificados para eIF5A total.

3.5. Avaliação da citotoxicidade dos candidatos em células de humano

3.5.1. Manutenção das linhagens celulares MCF7 e HepG2

As linhagens celulares MCF7 (adenocarcinoma de mama; ATTC: HTB-22) e HepG2 (carcinoma de fígado; ATCC: HB-8065) foram cultivadas em meio de cultura Gibco™ DMEM (*ThermoFisher Scientific*) suplementado com 10% de Gibco™ Soro Fetal Bovino (FBS, *ThermoFisher Scientific*) e 1% de solução Penicilina-Estreptomicina (PenStrep, *ThermoFisher Scientific*). As células foram mantidas em incubadora a 37° C e 5% de CO₂.

3.5.2. Avaliação da atividade citotóxica dos compostos usando Presto Blue

A toxicidade geral dos compostos foi avaliada utilizando o reagente de viabilidade celular Presto Blue™ (*Thermo Fisher Scientific*). As células de MCF7 e HepG2 foram transferidas para placas de 96 poços (TPP) a uma concentração de 10⁴ células/poço em 200 µL de meio de cultura e mantidas por aproximadamente 24 horas, até que as células aderissem à placa. Os compostos selecionados como candidatos a inibidor da DHS no ensaio em levedura foram adicionados na placa nas concentrações de 0,1 a 100 µM (concentração máxima de DMSO a 0,4%) e incubados por 24 horas. Também foi incluído no ensaio poços controles negativo (apenas meio de cultura) e controle de solvente (células com adição de 0,4% DMSO). Após 24 horas, 10% de *Presto Blue*™ foi adicionado e as células foram incubadas por 1 hora. A fluorescência da resofurina foi detectada a um comprimento de onda de 544 ± 15 nm para excitação e 590 ± 15 nm para emissão no espectrofluorímetro *POLARstar Omega plate reader* (BMG Labtech). Os experimentos foram realizados em duplicata, além de os experimentos terem sido repetido duas vezes.

A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pelo quociente entre os valores de intensidade de fluorescência das células tratadas pelos valores obtidos pelas células controle de solvente multiplicado por 100. As concentrações que inibem 50% do crescimento celular (IC₅₀) foram determinadas por regressão não-linear, onde a porcentagem de viabilidade celular foi plotada em relação ao log da concentração dos compostos no software *GraphPad PRISM* (versão 8.0 para o sistema operacional Microsoft Windows) e estes foram representados como a média ± o desvio padrão.

3.6. Padronização de ensaio enzimático *in vitro* para PvDHS e LmDHS

Essa etapa do trabalho foi realizada juntamente com a aluna de doutorado Angélica Hollundel Klippel (Projeto FAPESP 18/16672-1), usando as proteínas DHS que já haviam sido purificadas para o projeto da aluna. O monitoramento da atividade enzimática foi realizado mensurando a fluorescência do NADH gerado pela redução do cofator NAD⁺ dependente das DHSs (SILVA et al., 2020; WOLFF; WOLFF; PARK, 2000), através de um espectrofluorímetro *CLARIOstar plate reader* (BMG Labtech) empregando o comprimento de onda de 355 ± 15 nm para excitação e de 445 ± 20 nm para a emissão. Os ensaios foram realizados a 25° C, utilizando placas pretas de baixo volume de 384 poços (Corning), sendo as leituras registradas aproximadamente a cada 50 s após o início da reação (adição de NAD⁺ ou espermidina) por um período de 50 min. Primeiramente, foi realizado um teste de pH, utilizando os seguintes tampões: Tris-HCl pH 7,1; Hepes pH 7,5; Hepes pH 8; Glicina-NaOH pH 8,5; Glicina-NaOH pH 8,8; Glicina-NaOH pH 9; e Glicina-NaOH pH 9,1; para encontrar o pH ótimo para a atividade das enzimas. As reações foram realizadas em 0,1 M do tampão selecionado, contendo 1 mM de DTT; 0,025% de Tween e 5% de glicerol em um volume final de 15 µL. Foram realizados ensaios para determinar as concentrações das enzimas e os tempos de reação necessários para produzir a cinética linear da reação (dados não mostrados).

As concentrações das enzimas DHS, do substrato espermidina, do cofator NAD⁺ e do inibidor GC7 sofreram variações durante os ensaios enzimáticos. A Tabela 5, a seguir, resume a concentração final desses componentes em cada experimento realizado.

Tabela 5. Concentração dos reagentes utilizados nos ensaios enzimáticos.

Enzima	Experimento	[NAD ⁺] µM	[Espermidina] µM	[GC7] µM	[DHS] (tetrâmero) µM
LmDHS	Titulação do NAD ⁺	0,098 a 2000	100	-	0,5

	Titulação da espermidina	300	0,01 a 2000	-	0,5
	Inibição pelo GC7	142,5	50	0,0098 a 50	0,5
PvDHS	Titulação do NAD ⁺	4,39 a 2250	5000	-	1
	Titulação da espermidina	2550	9,76 a 20000	-	1
	Inibição pelo GC7	755	2245,5	0,008 a 1500	0,5

Para PvDHS, uma nova condição reacional precisou ser testada após análise dos resultados nas condições descritas acima (Tabela 5). Primeiramente, foi realizado um novo teste de pH, utilizando o tampão Tris-HCl nos pHs: 7,1; 7,5; 8,0; 8,5; 8,8 e 9,0. Após a seleção de um novo tampão, a concentração dos reagentes do mix reacional alteraram e estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração dos reagentes utilizados para PvDHS utilizando outro tampão.

Enzima	Experimento	[NAD ⁺] μM	[Espermidina] μM	[GC7] μM	[DHS] (tetramero) μM
PvDHS	Titulação do NAD ⁺	7,8 a 9000	1000	-	0,5
	Titulação da espermidina	3660	0,09 a 1250	-	0,5
	Inibição pelo GC7	1805	26,6	1,9 a 1000	0,5

Também foi preparada uma condição “branco”, constituída por todos os componentes da reação, com exceção da enzima, para cada um desses ensaios. Os dados foram normalizados subtraindo a média dos valores de fluorescência obtidos pelo branco das condições analisadas.

No ensaio de inibição pelo GC7, os componentes da reação, com exceção da espermidina, foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a reação foi iniciada pela adição da espermidina.

As velocidades iniciais das reações empregando concentrações variáveis de NAD⁺ ou de espermidina foram estimadas a partir das curvas de progresso da reação pelo ajuste não linear por mínimos quadrados da fase linear da reação. A dependência das velocidades iniciais pela concentração do substrato ou do cofator foi ajustada a uma hipérbole: $Y = V_{max} * X / (K_{obs} + X)$, em que V_{max} é a velocidade máxima da enzima, X é a concentração de substrato e K_{obs} é a concentração de substrato necessária para atingir a metade da velocidade enzimática máxima.

As concentrações que inibem 50% da velocidade da reação (IC_{50}) foram calculadas ajustando os dados obtidos no ensaio de inibição à equação: $Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{((LogIC_{50} - X) * HillSlope)})$, em que Top e $Bottom$ correspondem aos platôs superiores e inferiores, respectivamente, nas unidades da taxa de reação; IC_{50} é a concentração do antagonista que gera uma resposta intermediária entre Top e $Bottom$, X é o logaritmo da concentração de GC7 e $HillSlope$ descreve a inclinação das curvas (nesse caso foi empregado um valor padrão de -1). Os experimentos foram conduzidos em duplicata experimental, sendo que todos os experimentos foram repetidos duas vezes. A análise dos dados foi realizada no programa *GraphPad PRISM* (versão 8.0 para o sistema operacional Microsoft Windows) e estes foram representados como a média $\pm$ o erro padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Triagem *in silico* da coleção de moléculas do banco de dados ChEMBL-NTDs

Com o intuito de realizar o rastreamento *in silico* das coleções disponíveis no banco de dados ChEMBL-NTDs, foram gerados modelos estruturais por homologia, usando o software YASARA (LAND; HUMBLE, 2018), das proteínas DHS de *L. major* e *P. vivax*. Os modelos estruturais por homologia foram construídos com base nas estruturas cristalográficas evolutivamente mais similares disponíveis, considerando não apenas o alinhamento da sequência de aminoácidos, mas também a formação de homo ou hetero-complexos. Portanto, o modelo estrutural para PvDHS (Figura 4A) baseou-se na estrutura cristalográfica de HsDHS, 6P4V (TANAKA et al., 2020b), uma vez que há apenas um gene para DHS nesses organismos e nossos resultados de substituição funcional em leveduras (descritos mais adiante nos Resultados) sugerem que essas enzimas formam homotetrâmeros. O alinhamento dos átomos do modelo estrutural de PvDHS e da estrutura de HsDHS, 6P4V (TANAKA et al., 2020b) (Figura 4A), na qual essa estrutura se baseou, obteve um desvio médio quadrático (RMSD) de 0,458 Å, o que permite inferir que as estruturas de HsDHS e o modelo de PvDHS são similares. Apesar de PvDHS apresentar algumas extensões exclusivas, preditas como *coils* e alfa-hélices no modelo (na sequência primária compreendem os resíduos 226 até 275) (Figura 4A), a interface entre as subunidades (Figura 4B), local onde está localizado o sítio de ligação ao substrato de DHS (TANAKA et al., 2020a; UMLAND et al., 2004), é muito similar à de HsDHS (Figura 4B).

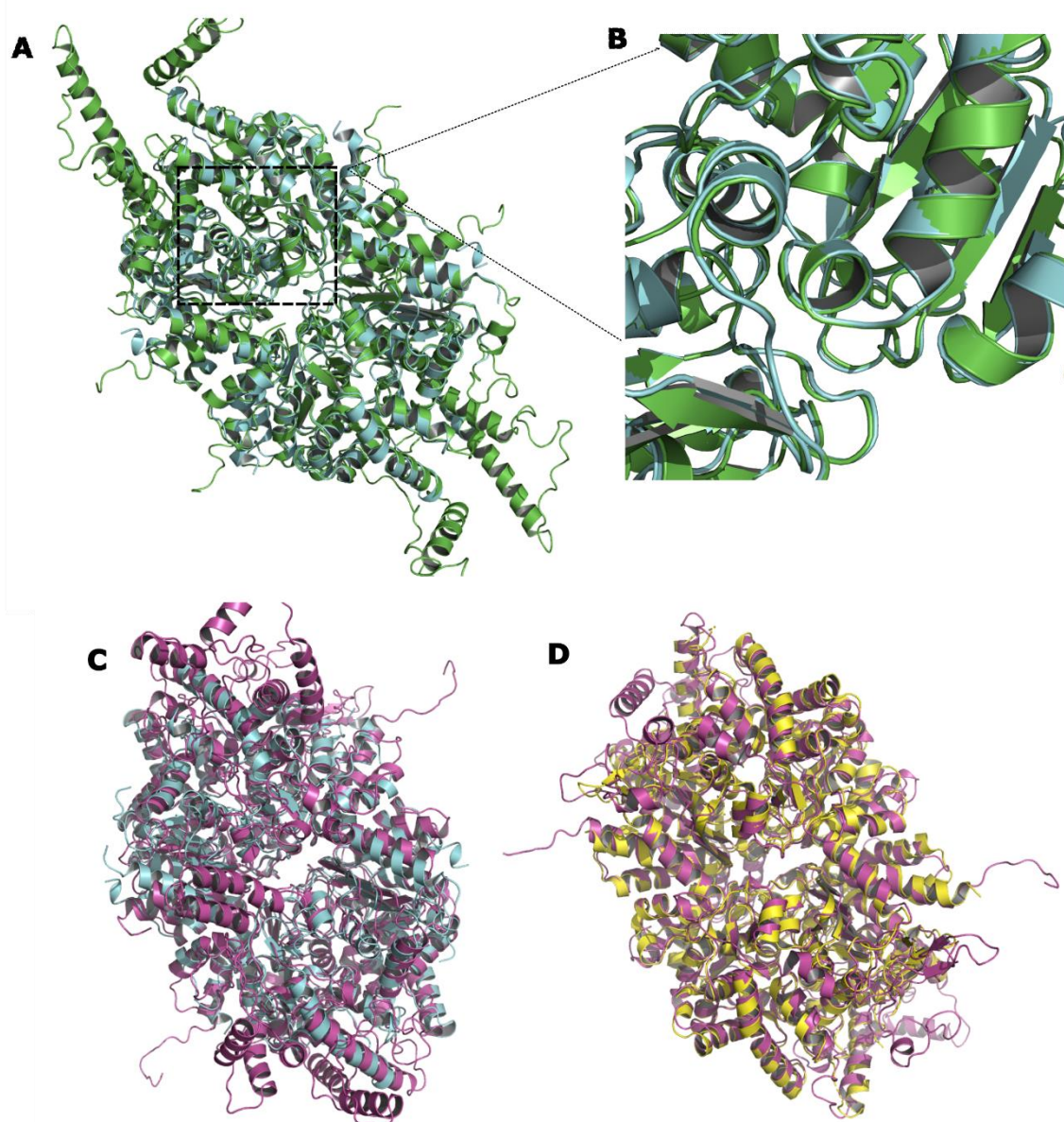


Figura 4. Modelos estruturais por homologia das proteínas DHS de *Plasmodium vivax* e *Leishmania major*. (A) Alinhamento da estrutura de PvDHS (verde) com a estrutura de HsDHS (TANAKA et al., 2020a) (azul) (RMSD = 0,458 Å). (B) Aproximação da interface entre as subunidades A e B de PvDHS (verde) sobreposto à HsDHS (azul). (C) Alinhamento da estrutura de LmDHS (roxa) com a estrutura de HsDHS (TANAKA et al., 2020a) (azul) (RMSD = 1,291 Å). (D) Alinhamento da estrutura de LmDHS (roxa) com a estrutura de TbDHS (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018) (amarelo) (RMSD = 0,997 Å).

Por outro lado, a presença de genes para as isoformas LmDHSc e LmDHSp em *L. major* (de maneira semelhante à DHS de *T. brucei*) e nossos resultados em levedura para LmDHSc e LmDHSp (SILVA et al., 2020) sugerem que a DHS de *L. major* seja funcional como um heterotetrâmero. Portanto, a modelagem de LmDHSc + LmDHSp foi baseada na DHS de *T. brucei* 6DFT (AFANADOR; TOMCHICK;

PHILLIPS, 2018) (Figura 4D, RMSD = 0,997 Å). No modelo de LmDHS gerado, as extensões de aminoácidos únicas de LmDHS foram modelados como *coils*. Essas inserções são ainda mais contrastantes quando observamos o alinhamento entre LmDHS e HsDHS (Figura 4C, RMSD = 1,291 Å). Tais inserções exclusivas de LmDHS fazem com que o modelo gerado seja de baixa qualidade (QMEAN = - 4,41), no entanto, o modelo apresentou o núcleo proteico conservado, bem como os resíduos catalíticos importantes, além de exibir alta similaridade local com a estrutura alvo de *T. brucei* DHS (Figura 4D, RMSD = 0,997 Å).

Como ainda não existem inibidores específicos para a enzima DHS de patógenos descrito em literatura, o sítio de ligação ao inibidor da DHS, GC7 (LIU et al., 2021) (Figura 5) foi utilizado para delimitação espacial da ancoragem dos compostos rastreados. Os resíduos homólogos aos do sítio ativo de HsDHS: Tyr176 (Tyr204C em PvDHS, Tyr186C em LmDHS); Asp 243 (Asp321C em PvDHS, Asp261C em LmDHS); Asn292 (Asn373D em PvDHS, Asn498 em LmDHS); Gly 314 (Gly395D em PvDHS, Gly520D em LmDHS) e Glu323 (Glu404D em PvDHS, Glu529D em LmDHS), foram selecionados para proposição do sítio de ancoragem molecular.

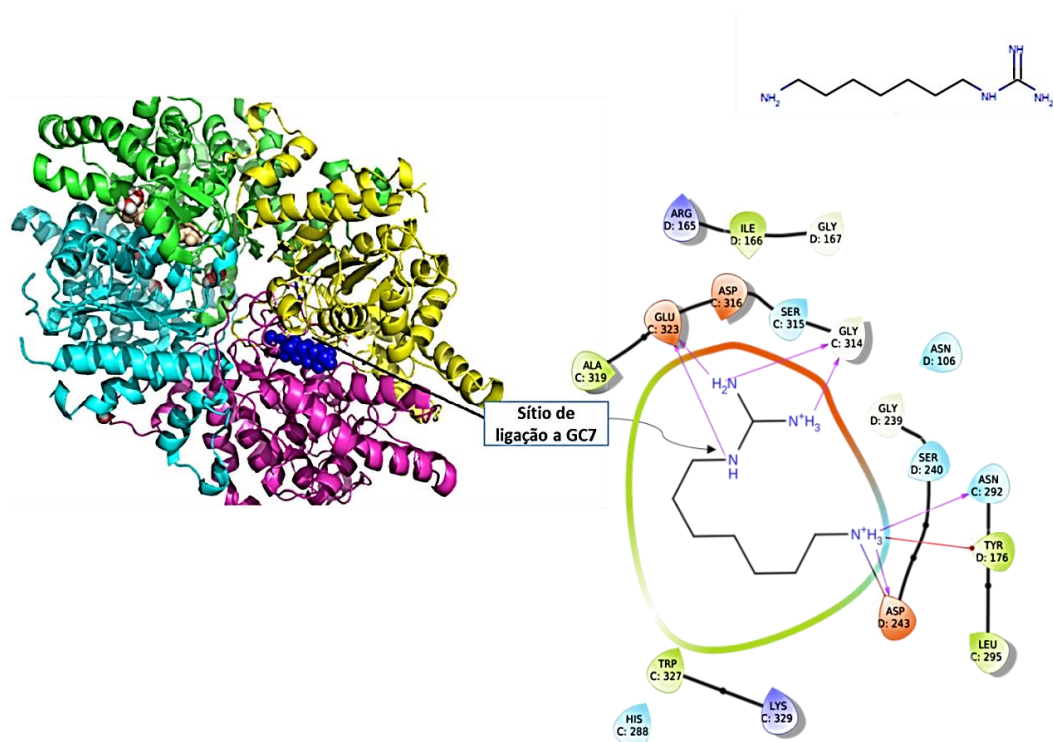


Figura 5. Resíduos de ligação de GC7 em HsDHS (PDB ID 6P4V). Os aminoácidos que ligam ao composto GC7 a 4 Å de distância estão representados pelo código de 3 letras representativos dos mesmos, seguidos da posição e cadeia a que pertencem. As setas roxas indicam ligações de hidrogênio e linhas vermelhas mostram interações cátion- π . As 4 subunidades do homotetrâmero estão representadas por cores diferentes. A estrutura 2D de GC7 está no lado superior direito da figura.

A coleção de compostos do banco de dados ChEMBL-NTDs foi escolhida para esse rastreamento, pois essa plataforma apresenta coleções de compostos pré-filtrados para compostos que já foram testados em ensaios fenotípicos em parasitas e informa quanto aos dados de toxicidade de alguns compostos em cultura de células de humano. Existem estudos relatando a proposição de alvos ou novos alvos que foram modulados por compostos desse repositório (PANDEY et al., 2018, 2021).

Através da triagem *virtual (in silico)* em larga escala realizada, dentre as 212.736 estruturas iniciais (considerando diferentes protonações para um composto - banco de dados ChEMBL-NTDs), 183 estruturas foram capazes de interagir no modelo computacional com o sítio catalítico de LmDHS e 214 com o sítio de PvDHS, de acordo com a metodologia aplicada (descrita em Material e Métodos). Essas estruturas também foram rastreadas na proteína DHS de *H. sapiens*, no modelo de alta resolução 6P4V (TANAKA et al., 2020b). Alguns parâmetros foram aplicados para seleção dos compostos que seriam adquiridos, tais como: apresentar *docking score* para PvDHS/LmDHS superior em relação ao de HsDHS humano; massa molecular entre 150 e 500 g/mol; C Log P entre -4 e 5; número de grupos doadores de hidrogênio menor que 5 e número de aceptores menor que 10 (LIPINSKI et al., 1997; VEBER et al., 2002); potência inibitória descrita no parasita (dados descritos na Tabela 7) e por fim, foi realizada uma avaliação visual dos compostos no sítio ativo, verificando a disposição espacial dos ligantes no sítio ativo, bem como as interações realizadas (ligações de hidrogênio, ligações de halogênio e interações hidrofóbicas) entre os compostos e os resíduos de aminoácidos (Dissertação Ana Paula Biazotto da Silva, dados não publicados).

Tabela 7. *Docking score* e propriedades químicas dos compostos selecionados por triagem virtual.

ID do Composto ^a	Alvo	<i>Docking score</i> (alvo) (kcal/mol)	<i>Docking score</i> (HsDHS) (kcal/mol)	Massa molecular (g/mol)	cLog P	Doadores/Aceptores de H	Inibição em parasita (EC ₅₀) ^b
GNF-Pf-3680	PvDHS	-8.565	-5,290	382.4	1.7	4/8	0,00011 µM (<i>T. brucei</i> bloodstream form)
CHEMBL1081521	PvDHS	-8.377	-4,157	340.2	1.8	4/6	0,2 µM (<i>P. falciparum</i> – ensaio baseado

							em eritrócitos)
							0,48 μM (<i>P. falciparum</i> – ensaio baseado em eritrócitos)
GNF-Pf-744	PvDHS	-7,643	-2,132	356.3	2.9	1/5	Valor não descrito
CHEMBL3493253	PvDHS	-7.623	-6,290	317.4	0.2	2/4	0,77 μM (<i>P. falciparum</i>)
TCMDC-124630	LmDHS	-9,228	-3,901	385.5	2.7	1/5	Valor não descrito
ZINC518875	LmDHS	-7,259	-1,790	324.4	3.1	2/5	0,365 μM (<i>P. falciparum</i> – ensaio baseado em eritrócitos)
GNF-Pf-4241	LmDHS	-7,236	-2,566	418.2	3.2	1/4	0,1653 μM (<i>P. falciparum</i> – ensaio baseado em eritrócitos)
GNF-Pf-3738	LmDHS	-7,142	-2,807	306.3	3.5	2/4	0,77 μM (<i>P. falciparum</i>)
CHEMBL1305755	LmDHS	-7,458	-4,233	421.9	1.6	3/8	

^a As estruturas 2D dos compostos estão representadas na Tabela 4.

^b Os valores de EC₅₀ dos compostos em parasitas estão descritos no repositório ChEMBL-NTD (<https://chembl.gitbook.io/chembl-ntd/>).

Essas propriedades físico-químicas foram utilizadas para seleção das moléculas por serem importantes preditores da biodisponibilidade oral de um composto (LIPINSKI et al., 1997; VEBER et al., 2002). Considerando os valores de pontuação obtidos por *docking* e os parâmetros físico-químicos analisados, aproximadamente 50 compostos foram classificados como ligantes de DHS no total, mas grande parte destes compostos não estavam disponíveis comercialmente. Assim, 9 compostos foram selecionados para aquisição (Tabela 7) e futuro testes de inibição da DHS usando sistemas de levedura.

Através das análises *in silico* de *docking* molecular, observou-se que os ligantes estavam posicionados na interface entre as subunidades C e D, como esperado (Figura 6). Na Figura 6 estão representadas as interações sugeridas por modelagem

molecular, entre 4 dos ligantes selecionados pela triagem virtual: GNF-Pf-744, GNF-Pf-3738, ZINC518875 e GNF-Pf-4241, e resíduos nas subunidades C e D diretamente envolvidos na interação entre esses compostos no sítio ativo de PvDHS ou LmDHS.

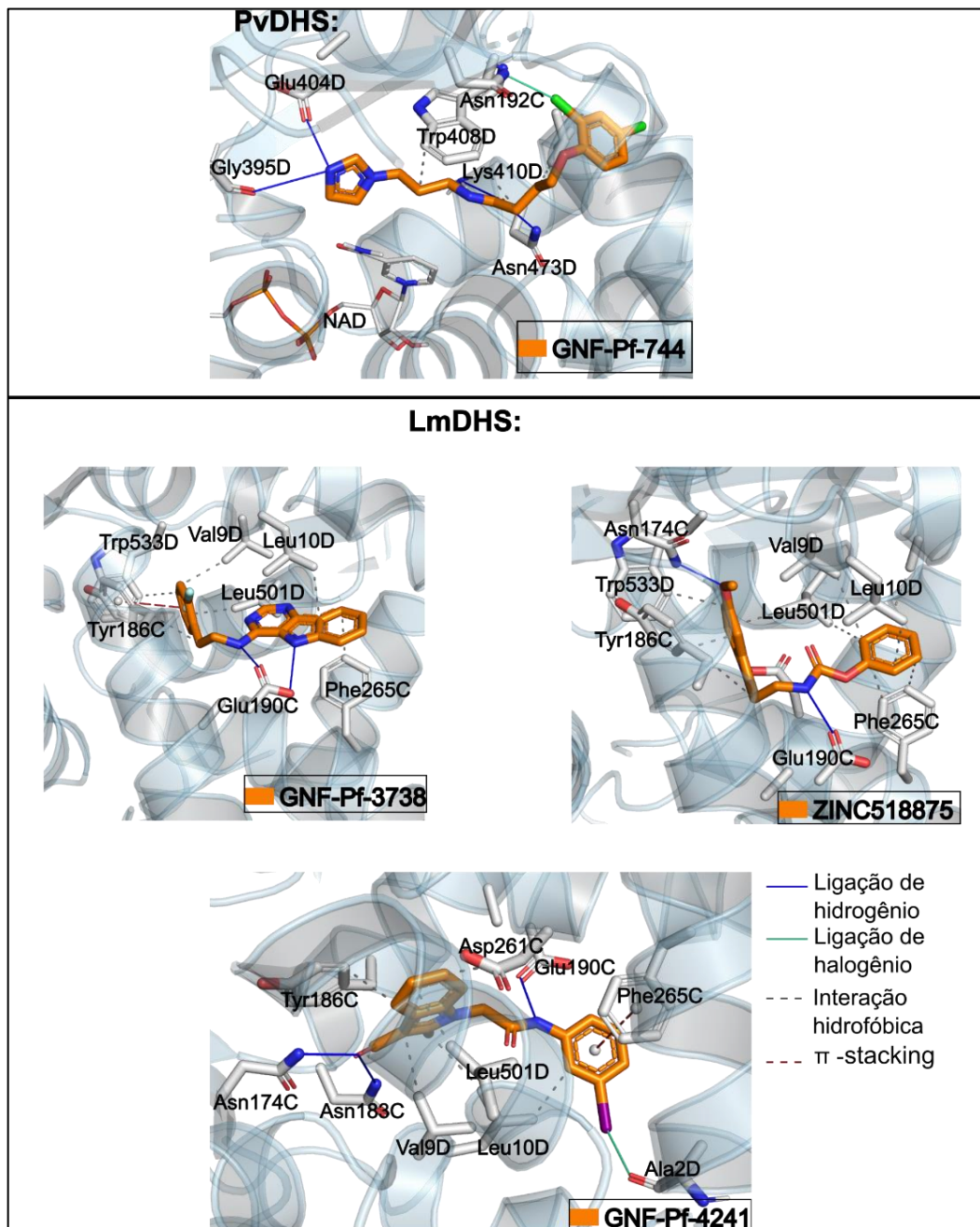


Figura 6. Novos ligantes de PvDHS e LmDHS por rastreamento *in silico*. Os aminoácidos que interagem com os compostos dentro de 4 Å de distância estão representados pelo código de 3 letras, seguidos da posição e subunidade a que pertencem. O nome dos compostos e a legenda dos tipos de interações estão indicados na figura.

O composto GNF-Pf-744 não foi o que obteve maior valor de pontuação no *docking* (Tabela 7), no entanto, visualmente foi o composto com o maior número de interações fortes estabilizando o composto no sítio ativo da proteína PvDHS. A porção

amida de GNF-Pf-744 realiza ligações de hidrogênio com as cadeias laterais dos resíduos Asn373D e Lys410D, além de outras ligações de hidrogênio ocorrerem entre a molécula e Gly395D e Glu404D. Também ocorrem interações hidrofóbicas entre o composto e os resíduos Leu376D e Trp408D. E, por fim, uma ligação de halogênio ocorre entre um cloro da molécula e Asn192C (Figura 6). Recentemente foram descritos ligantes da DHS de humano que tiveram seu percentual de inibição da DHS melhorado após a adição de halogênios (LIU et al., 2021; TANAKA et al., 2020a).

Como demonstrado na Figura 6, GNF-Pf-3738 e ZINC518875 (Tabela 4) interagem com vários aminoácidos em comum no sítio de ligação em LmDHS. Ambos os compostos interagem via ligação de hidrogênio com a cadeia lateral de Glu190C e ocorrem interações hidrofóbicas entre essas moléculas e os resíduos Val9D, Leu10D, Phe265C, Leu501D e Trp533C. Uma ligação de hidrogênio extra ocorre entre a cadeia lateral de Asn174C e ZINC518875 e uma interação hidrofóbica ocorre entre essa molécula e o resíduo Tyr186C, enquanto que em GNF-Pf-3738 uma interação do tipo π -stacking ocorre com esse resíduo (Figura 6). Já o composto GNF-Pf-4241, interage com LmDHS via ligações de hidrogênio com os resíduos de Glu190C, Asn174C e Asn188C e de ligações de halogênio entre o átomo de bromo e Ala2D. Também ocorrem interações hidrofóbicas entre esse composto ocorre e os resíduos Val9D, Leu10D, Tyr186C, Asp261C e Leu 501D.

4.2. Geração da primeira versão da plataforma de *S. cerevisiae* com substituição da DHS endógena pelas enzimas DHS dos organismos patogênicos

4.2.1. Clonagem das DHSs dos patógenos eucariotos no vetor de expressão em *S. cerevisiae*

O organismo modelo *S. cerevisiae* tem sido usado como uma ferramenta importante para entender a função de enzimas heterólogas (BILSLAND et al., 2011) e para a busca de inibidores direcionados a um alvo específico (BILSLAND et al., 2018; TAVELLA et al., 2021a; WILLIAMS et al., 2015). A substituição funcional de genes essenciais em leveduras por genes ortólogos de organismos patogênicos também pode ser empregada como alternativa para programas de rastreamento de drogas alvo-direcionadas em situações em que as proteínas estudadas são insolúveis para produção recombinante em *E. coli*. Além disso, a substituição do gene essencial de

levedura por seu homólogo de *H. sapiens* fornece um controle para identificar pequenas moléculas que inibem mais a proteína do organismo patogênico que a de humano (BILSLAND et al., 2016b).

Para desenvolver uma plataforma para o estudo da enzima DHS dos organismos eucariotos patogênicos de interesse nesse trabalho, primeiro inserimos seus respectivos genes no plasmídeo de expressão de *S. cerevisiae* pCM188 (Tabela 1). Este plasmídeo foi escolhido pelo fato de possibilitar a modulação da transcrição através do promotor reprimível por tetraciclina (Tet-Off system) (CUPERUS et al., 2015). Esta característica é desejável para reduzir a concentração celular da enzima alvo do estudo uma vez que esta redução do alvo pode favorecer o rastreamento de novos inibidores por diminuir a concentração inibitória mínima necessária para resultados durante o rastreamento (BILSLAND et al., 2016b).

Para a clonagem em pCM188, as sequências codificantes das DHS de *H. sapiens*, *B. malayi*, *L. major* e *P. vivax* foram amplificadas por PCR (Figura 7). Uma vez que *L. major*, e outros tripanossomatídeos, possuem 2 parálogos de DHS e foi demonstrado que DHS de *Trypanosoma brucei* é composta de heterotetrâmeros (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018), ambos parálogos de *L. major* foram testados. Desta forma, para os genes DHS parálogos de *L. major* foram desenhados pares adicionais de primers para amplificar um fragmento contendo as duas isoformas de LmDHS fusionadas à sequência do peptídeo 2A do vírus ERBV (LmDHSc + LmDHSp, Figura 7). O peptídeo 2A desencadeia um mecanismo de recodificação ribossomal, conhecido como *ribosomal skipping*, em que ocorre um “salto” de um códon para o próximo códon sem a formação de ligação peptídica, permitindo a tradução de dois polipeptídeos diferentes a partir de um mesmo transcrito (DONNELLY et al., 2001). Assim, as sequências codificantes de LmDHS que foram projetadas fusionadas, inseridas anterior e posterior ao peptídeo 2A, são traduzidas em duas proteínas separadas, LmDHSp e LmDHSc, que se enovelam independentemente (SOUZA-MOREIRA et al., 2018b; YANG et al., 2017).

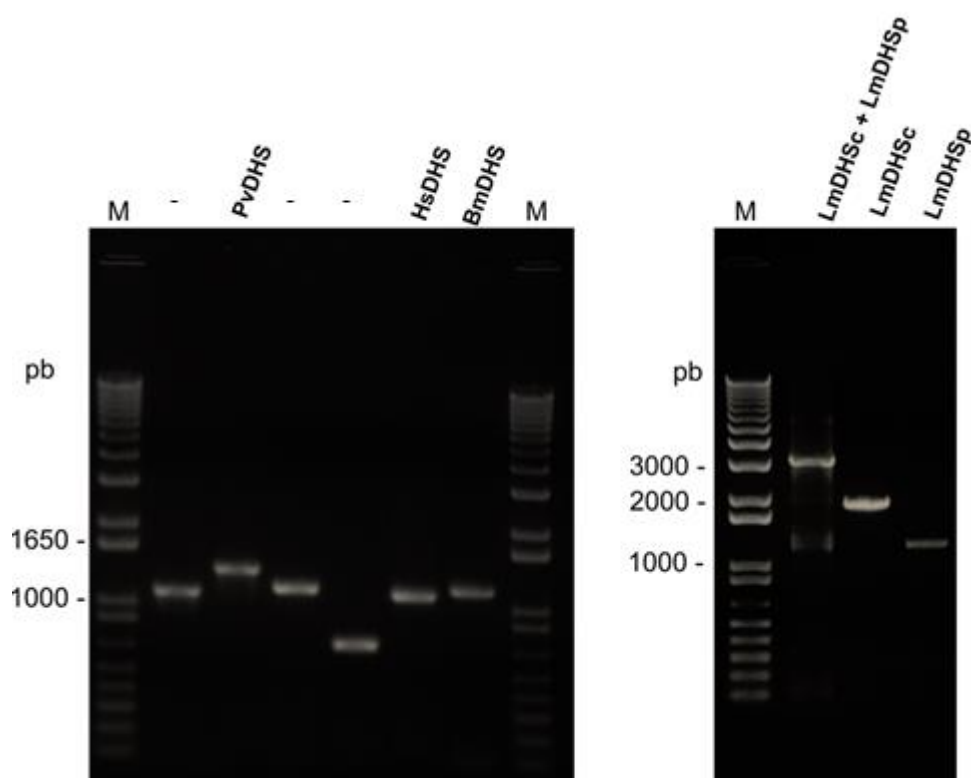


Figura 7. Análise em gel de agarose dos fragmentos amplificados por PCR. Amplicons das construções DHS de *P. vivax* (PvDHS), *B. malayi* (BmDHS), *H. sapiens* (HsDHS), *L. major* catalítica (LmDHSc), *L. major* proenzima (LmDHSp) e duas isoformas de *L. major* fusionadas ao fragmento de ERBV (LmDHSc + LmDHSp). Tamanho esperado dos amplicons: PvDHS: 1395pb; BmDHS: 1128pb; HsDHS: 1110pb; LmDHSc + LmDHSp: 3012pb; LmDHSc: 1833pb; LmDHSp: 1167pb. M: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Os fragmentos amplificados foram purificados, sendo que para o fragmento fusionado de LmDHSc + LmDHSp (Figura 7) a banda correspondente à aproximadamente 3000pb foi extraída do gel e purificada, e clonados no plasmídeo pCM188 (Figura 8). As clonagens foram confirmadas por PCR de colônia usando primers que anelavam na sequência do promotor e do terminador CYC1 no plasmídeo pCM188 (Tabela 3), e sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

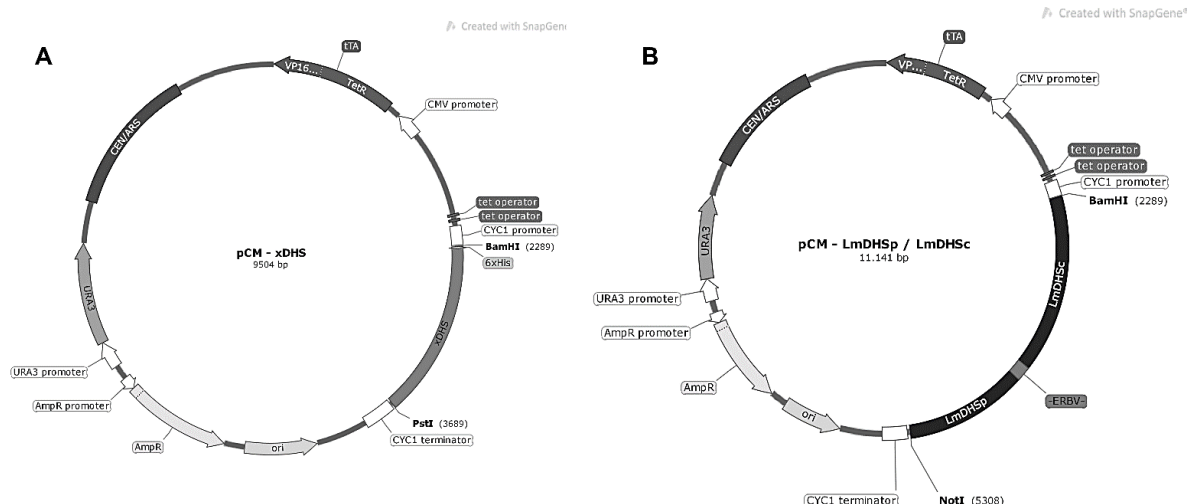


Figura 8. Esquema do sítio de clonagem dos genes DHS em pCM188. A clonagem de HsDHS, BmDHS e PvDHS em pCM188 está representada em **(A)**, enquanto a clonagem das isoformas de LmDHS fusionadas ao fragmento de ERBV (LmDHSp / LmDHSc) está representada em **(B)**. Elementos presentes no vetor pCM188: URA3, marca de seleção em *S. cerevisiae*; CEN/ARS, origem de replicação em *S. cerevisiae* para baixo número de cópias (em média 1 por célula) (GARÍ et al., 1997).

4.2.2. Substituição funcional de ScDHS pelas enzimas DHS de *H. sapiens*, *B. malayi*, *L. major* e *P. vivax*

Para gerar tal plataforma para DHS em *S. cerevisiae*, produzimos linhagens mutantes com a deleção do gene endógeno que codifica ScDHS (*DYS1*) substituída pelos ortólogos dos eucariotos causadores de DTNs ou pelo gene que codifica DHS em *H. sapiens* (geração das linhagens descrita em Material e Métodos). Como a enzima DHS é essencial para a viabilidade em *S. cerevisiae*, assim como em arqueias e todos os eucariotos testados até o momento (AROONSRI et al., 2019a; CHAWLA et al., 2010; NGUYEN et al., 2013b; NISHIMURA et al., 2012a; PARK; AE JOE; RYEON KANG, 1998), a capacidade de a enzima heteróloga em substituir a DHS endógena pode ser determinada pela capacidade de crescimento das linhagens. A linhagem também possui deleção de *PDR5*, gene que codifica para um transportador de membrana da família ABC (*ATP-binding cassette*). *PDR5* está envolvido na resistência pleiotrófica a drogas e seu nocaute é útil para triagens de drogas (BILSLAND et al., 2016a; ROGERS et al., 2001). As deleções de *DYS1* e *PDR5* foram confirmadas por PCR de colônia (Figura 9).

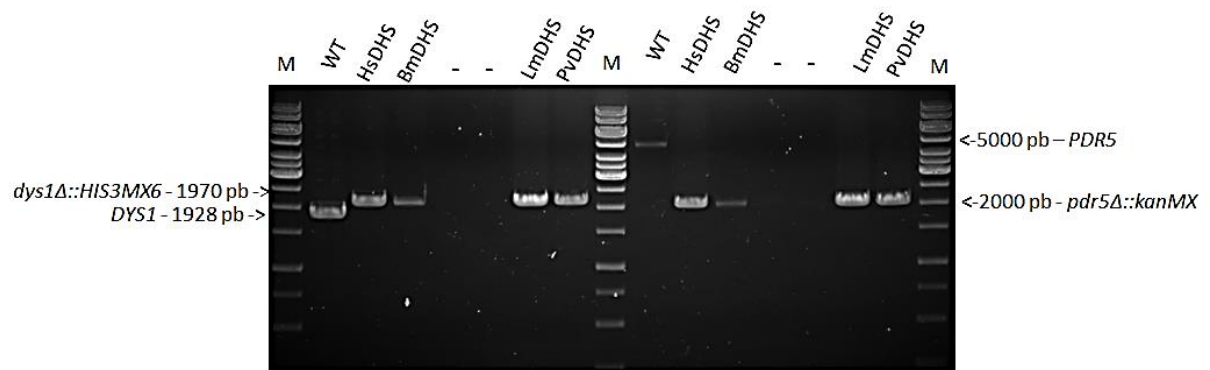


Figura 9. PCR de colônia para confirmação da deleção de *DYS1* e *PDR5* nas linhagens complementadas por *H. sapiens*, *B. malayi*, *L. major* e *P. vivax*. M: GeneRuler 1kb DNA Ladder (ThermoFisher).

Foram geradas linhagens com deleção cromossomal de *DYS1* (Figura 9) e contendo os plasmídeos pCM188 (Figura 8), contendo os genes DHS de *H. sapiens*, *L. major*, *P. vivax* (Figura 10A). Esses dados aqui descritos para geração das linhagens e validação das mesmas para avaliação da capacidade de inibição foram publicados durante o segundo ano de doutorado da aluna (SILVA et al., 2020).

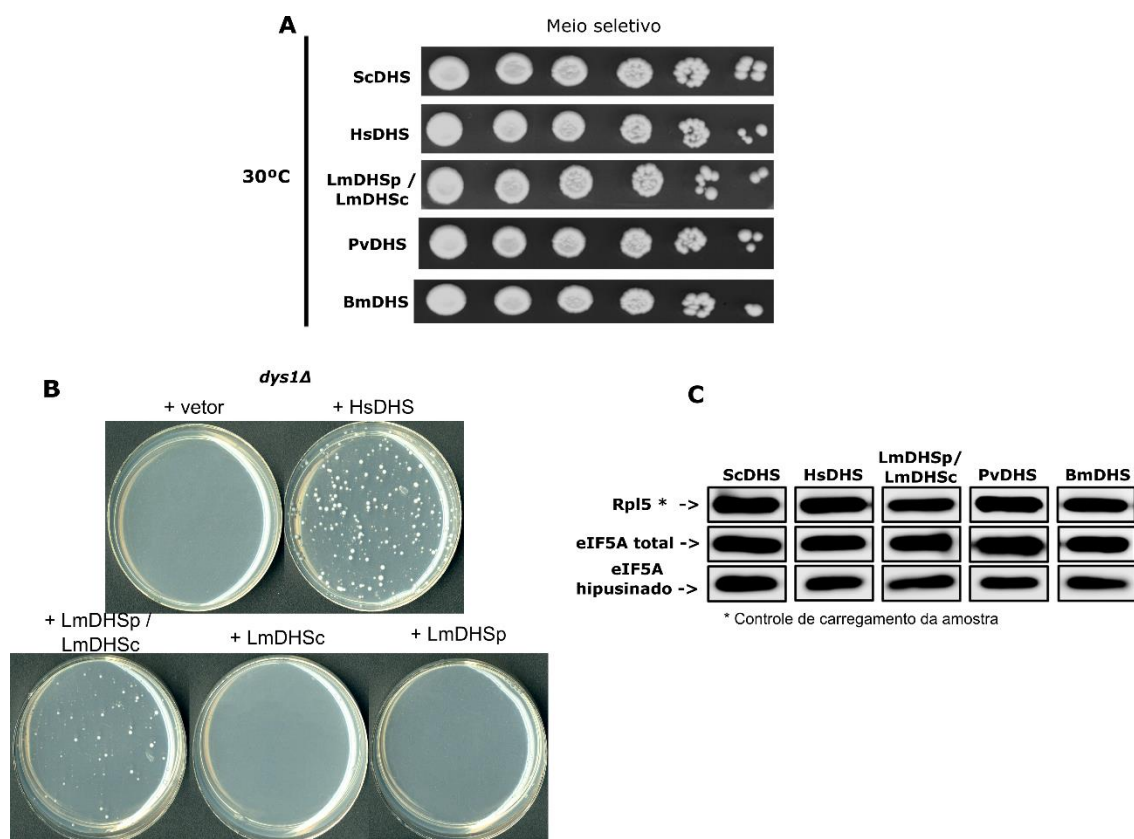


Figura 10. Substituição funcional (complementação) da DHS de *S. cerevisiae* pelas enzimas ortólogas de *H. sapiens*, *B. malayi*, *L. major* e *P. vivax* (VZL1464,

VZL1400, VZL1474 e VZL1472, Tabela 2). (A) Diluições seriadas de dez vezes das linhagens indicadas (após seleção do haplóide - ver Material e Métodos) foram plaqueadas em meio seletivo e crescidas a 30 °C por 3 dias. (B) Complementação da DHS de *S. cerevisiae* apenas pelas duas isoformas da DHS de *L. major* (LmDHSp / LmDHSc). (C) Hipusinação da eIF5A de levedura por linhagens complementadas com DHS dos organismos indicados. Fonte: Adaptado de (SILVA et al., 2020).

Diferente da maioria das arqueias e eucariotos, dois genes diferentes para a DHS estão presentes em *L. major*, de forma semelhante a outros tripanossomatídeos (CHAWLA et al., 2010; NGUYEN et al., 2013b). Considerando que em *T. brucei* foi demonstrado que ambos os polipeptídeos da DHS, codificados pelos genes parálogos, são necessários para a formação de um tetrâmero funcional da DHS (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018), testamos os genes da DHS de *L. major* (LmDHSp e LmDHSc) separadamente e em combinação (LmDHSp / LmDHSc) (Figura 10B). Apenas a expressão concomitante de ambos os genes (LmDHSp / LmDHSc) permitiu o crescimento da linhagem sem sua versão endógena (Figura 10A e Figura 10B). Esses resultados sugerem que o heterocomplexo dos produtos proteicos LmDHSp e LmDHSc é necessário para gerar uma enzima funcional, assim como ocorre com a DHS de *T. brucei* (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018).

A função essencial da DHS está diretamente relacionada ao seu requerimento na hipusinação, modificação de eIF5A necessária para a função desse fator de tradução (PARK; WOLFF, 2018a). Portanto, também testamos a hipusinação da eIF5A de *S. cerevisiae* pelas enzimas DHS ortólogas (Figura 10C). Os ortólogos de eIF5A de *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *P. vivax* e *L. major* possuem altos níveis de identidade de sequência (> 50%), especialmente em sua região N-terminal (> 60%), que é necessária para reconhecimento e modificação por DHS (PARK; WOLFF, 2018a). Como esperado, as linhagens capazes de complementação funcional da DHS de levedura, também demonstraram hipusinação de eIF5A (Figura 10C). Estes resultados juntos demonstram que as enzimas DHS de *L. major* e *P. vivax* são funcionais em *S. cerevisiae*.

4.3. Validação da plataforma nas linhagens complementadas pela DHS de *H. sapiens*, *B. malayi* e *P. vivax* para teste de compostos

Para demonstrar que este sistema pode ser usado para identificar compostos que inibem a atividade de DHS, testamos o efeito do inibidor de DHS, GC7 (JAKUS

et al., 1993), no crescimento dos mutantes *dys1Δ* expressando a DHS de *L. major*, *B. malayi*, *P. vivax* e a DHS de *H. sapiens* (Figura 11).

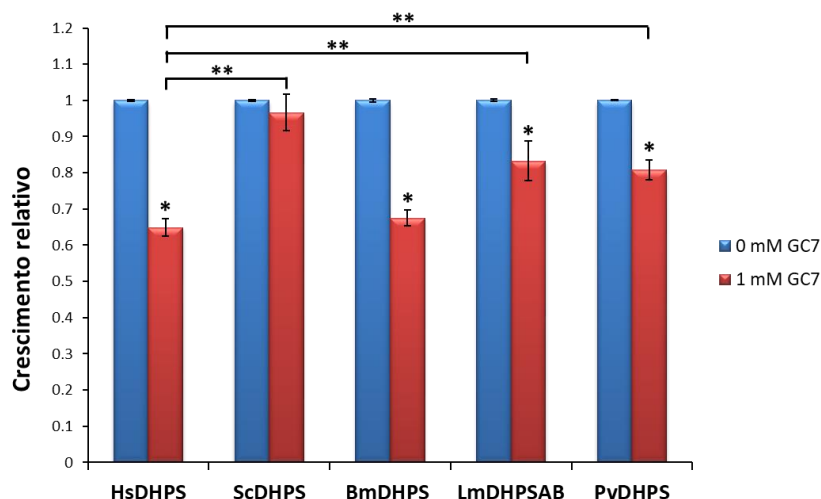


Figura 11. O ensaio utilizando a plataforma de *S. cerevisiae* pode detectar inibidores de DHS. As barras mostram o score de crescimento relativo das cepas *dys1Δ* de *S. cerevisiae* complementadas pelas enzimas DHS indicadas e o score de crescimento relativo da linhagem selvagem isogênica VZL1462 (ScDHS - Tabela 2) na presença de 1 mM de GC7. Um único asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas (teste t-Student $p < 0,05$) entre o score do crescimento de cepas individuais na presença ou ausência de GC7. Dois asteriscos (**) indicam diferenças estatisticamente significativas (teste Tukey $p < 0,05$) entre o score do crescimento relativo das demais linhagens em relação a linhagem HsDHS. Fonte: Adaptado de (SILVA et al., 2020).

O efeito de GC7 no crescimento celular foi mais pronunciado em células *dys1Δ* complementadas com DHS de *H. sapiens* e *B. malayi* (redução de aproximadamente 35% na taxa de crescimento na presença de 1 mM de GC7) do que naquelas complementadas por LmDHSp/DHSc e PvDHS (redução de aproximadamente 15% na taxa de crescimento na presença de 1 mM de GC7) (Figura 11). Além disso, a linhagem ScDHS (selvagem, Linhagem VZL1462, Tabela 2) foi menos sensível a GC7 em comparação com as linhagens heterólogas. Levando em consideração que essas linhagens têm background genético isogênico, as diferenças na sensibilidade a GC7 observadas entre as linhagens complementadas com DHS de diferentes espécies devem estar ligadas à capacidade diferencial de GC7 de inibir essas enzimas (Figura 11). Dessa forma, nossos resultados sugerem que essas linhagens complementadas podem ser usadas para identificar novas moléculas pequenas ativas contra DHS.

No entanto, é importante salientar que foi necessário o uso de GC7 a uma concentração final de 1 mM para observar efeito no crescimento em levedura,

provavelmente devido à baixa permeabilidade do composto nas células. Em ensaios de rastreamento quimio-genético e curvas de crescimento, realizados por um ex-aluno de mestrado deste grupo de trabalho, Luis Camanho Iglesias, a linhagem mutante de *PDR5* também não foi sensível a GC7 (Dissertação Luis Camanho Iglesias; dados não publicados). Assim, mesmo que a linhagem nocaute para *PDR5* faça com que a levedura seja sensível à entrada de uma grande variedade de pequenas moléculas na célula (ROGERS et al., 2001), o mesmo não se aplica a GC7.

4.4. Geração de uma segunda versão da plataforma de substituição da DHS em *S. cerevisiae* para teste de inibidores

Com o intuito de buscar inibidores para DHS através de ensaios em larga escala utilizando *S. cerevisiae*, uma nova plataforma com as seguintes modificações foi gerada: 1- utilização de deleções de fatores de resistência pleiotrópica a moléculas pequenas; 2- inclusão de diferentes marcadores fluorescentes para cada linhagem; 3- inserção cromossomal dos genes DHS ortólogos.

A implementação dessas modificações genéticas é muito importante, principalmente para futuros experimentos em larga escala, pois permitem a realização dos testes de inibição por ensaios de fluorescência e garantem uma expressão mais homogênea da proteína exógena, aumentando a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados (DA SILVA; SRIKRISHNAN, 2012).

4.4.1. Utilização de deleções de fatores de resistência pleiotrópica a moléculas pequenas

Foi demonstrado previamente que a deleção concomitante dos genes *PDR1*, *PDR3* e *SNQ2*, os quais afetam de forma importante a resposta pleiotrópica a moléculas pequenas, aumenta significativamente o número de compostos a que essa linhagem é sensível (PIOTROWSKI et al., 2017b). *PDR1* e *PDR3* (*Pleiotropic Drug Resistance*) codificam fatores de transcrição redundantes que regulam positivamente a expressão de diversos transportadores de membrana envolvidos na resistência múltipla a drogas; *SNQ2* (*Sensitivity to NitroQuinoline-oxide*), codifica um transportador de membrana plasmática do tipo ABC (*ATP-binding cassette*).

Para isso, foram criadas novas linhagens modificadas para DHS no *background* genético da linhagem HA_SC_1352control (ALALAM et al., 2021) (Tabela 2). A partir

dessa linhagem foram realizadas modificações para gerar linhagens produzindo as proteínas fluorescentes *mCherry*, *Sapphire* e *Venus* (SFS01, SFS02 e SFS03, respectivamente, Tabela 2), e com substituição do gene essencial *DYS1* (codifica DHS em *S. cerevisiae*) por genes DHS de *H. sapiens*, *P. vivax* e *L. major* (SFS04, SFS05 e SFS06, respectivamente, Tabela 2) integrados ao genoma.

4.4.2. Integração das proteínas fluorescentes *mCherry*, *Sapphire* e *Venus*

As sequências codificantes para *mCherry*, *Sapphire* e *Venus*, sob controle do promotor constitutivo do gene *TDH3*, foram transformados na linhagem HA_SC_1352control (Tabela 2). A transformação continha fragmentos lineares dos RNAs guias que direcionaram o sítio de reconhecimento (sequência PAM) no *locus* de *CAN1* por Cas9, gerando assim uma quebra da dupla fita de DNA. Por fim, por reparo dirigido por homologia, *mCherry*, *Sapphire* e *Venus* foram inseridos no *locus* de *CAN1*, gerando as linhagens SFS01, SFS02 e SFS03 (Tabela 2).

A transformação foi plaqueada em meio sem histidina, seletivo para o plasmídeo pWS172 (*HIS3*), expressando Cas9 e sgRNA recircularizado em levedura. O plaqueamento da transformação sem o produto de PCR apresentou pouquíssimas colônias em relação a reação adicionando o produto de PCR que repara a quebra do DNA (dados não mostrados). A confirmação da integração foi realizada por PCR de colônia (Figura 12) e sequenciamento do produto da PCR de colônia.

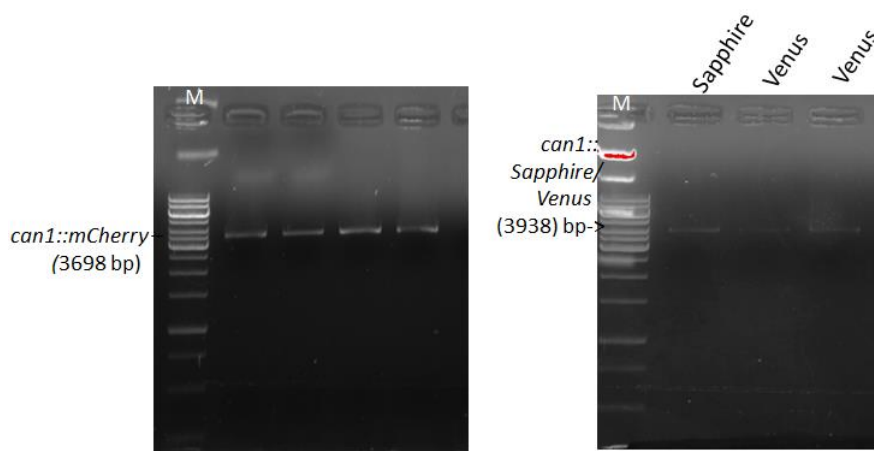


Figura 12. PCR de colônia demonstrando inserção de *mCherry*, *Sapphire* e *Venus* no *locus* de *CAN1*. Tamanho esperado dos amplicons: *can1::mCherry*: 3698pb; *can1::Sapphire/Venus*: 3838pb; *CAN1*: 2152pb. M: GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (ThermoFischer Scientific).

4.4.3. Deleção de *DYS1* e integração de DHSs de *H. sapiens*, *P. vivax* e *L. major*

Primeiramente, os genes DHS de *H. sapiens*, *P. vivax* e *L. major* foram subclonados nos sítios *Bam*HI e *Pst*II do plasmídeo pCM188-MET3 (Tabela 1), gerando as novas construções pCM188-MET3-HsDHS, pCM188-MET3-PvDHS e pCM188-MET3-LmDHSc/LmDHSp (Tabela 1), para que na linhagem final a expressão gênica de DHS esteja sob controle transcricional do promotor MET3pr. O promotor de *MET3* é reprimido condicionalmente pela adição de metionina no meio de cultura (MAO et al., 2002), possibilitando assim a regulação da expressão gênica de DHS condicional a expressão do promotor.

Os cassetes MET3pr-HsDHS-CYC1t, MET3pr-PvDHS-CYC1t e MET3pr-LmDHSc/LmDHSp-CYC1t foram amplificados por PCR com *primers* contendo extremidades homólogas ao *locus* de *DYS1* (Tabela 3). O produto de PCR serviu para substituir o gene selvagem de *DYS1* das linhagens SFS02, SFS01 e SFS03, respectivamente.

A transformação também continha fragmentos lineares dos RNAs guias que direcionaram o sítio de reconhecimento (sequência PAM) dentro da ORF de *DYS1* por Cas9, gerando assim uma quebra da dupla fita de DNA. Por fim, por reparo dirigido por homologia, a ORF de *DYS1* foi substituída pelas sequências de DHS de *H. sapiens* (SFS04, Tabela 2) e *P. vivax* (SFS05, Tabela 2), recém integradas em substituição funcional a *Dys1* endógena (DICARLO et al., 2013; LEE et al., 2015). A confirmação da integração foi realizada por PCR de colônia (Figura 13) e sequenciamento do produto da PCR de colônia (dados não mostrados).

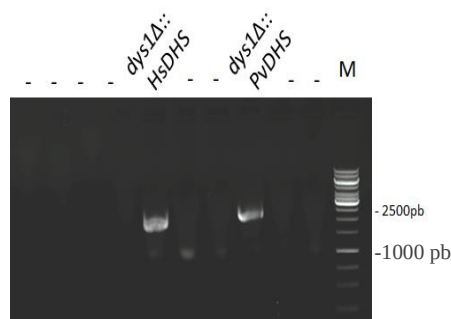


Figura 13. PCR de colônia demonstrando inserção de HsDHS e PvDHS no *locus* de *DYS1*. Tamanho esperado dos amplicons: *dys1Δ::HsDHS*: 1893 pb; *dys1Δ::PvDHS*: 2178 pb; *DYS1*: 1227 pb. M: Gene ruler 1 Kb DNA Ladder (ThermoFischer Scientific).

Para LmDHS, não ocorreu complementação funcional quando a expressão gênica estava sob controle do promotor MET3pr (dados não mostrados). Uma construção extra contendo o cassete pPGK1-LmDHSc-tCYC1/pTEF1-LmDHSp-tADH1 foi amplificada por PCR com *primers* contendo extremidades homólogas ao *locus* de *DYS1* (Tabela 3), uma vez que o gene seria expresso sob controle de promotores constitutivos fortes. Usando essa construção, a ORF de *DYS1* foi substituída pelas sequências de DHS de *L. major*, gerando SFS06 (Tabela 2). A confirmação da integração foi realizada por PCR de colônia e sequenciamento do produto da PCR de colônia (dados não mostrados).

4.5. Rastreamento de inibidores das DHS de *L. major* e *P. vivax* utilizando ensaio em plataforma em *S. cerevisiae*

4.5.1. Validação da plataforma utilizando ensaios fenotípicos em Bioscreen

As linhagens complementadas pelas DHS de *H. sapiens*, *P. vivax* e *L. major* (SFS04, SFS05 e SFS06, respectivamente, Tabela 2) foram testadas quanto a sua capacidade de identificar inibidores da DHS, através do crescimento diferencial das linhagens na presença e ausência de compostos. O inibidor GC7 (JAKUS et al., 1993) foi utilizado para validação inicial da plataforma por ensaios preliminares de absorbância no equipamento *Bioscreen C plate reader* (Oy Growth Curves Ab Ltd).

Nas linhagens complementadas pelas enzimas DHS de *H. sapiens* e *P. vivax* (SFS04 e SFS05, respectivamente), GC7 foi testado quanto ao seu potencial inibitório da DHS quando haviam diferentes níveis de DHS sendo expressos, regulados pela expressão do promotor de *MET3* (diferentes concentrações de metionina) (Figuras 14 e 15). Já está descrito por outros estudos em plataformas de descoberta de drogas em levedura que a redução da expressão da proteína alvo facilita a inibição do crescimento da levedura pelos compostos testados (BILSLAND et al., 2016b). Assim, verificamos se o mesmo ocorre para as enzimas DHSs das espécies estudadas nesse trabalho (Figuras 14, 15, 16 e 18).

A redução dos níveis de expressão de HsDHS, usando 30 e 130 μ M de metionina no meio de cultura, reduziu o rendimento celular e a taxa de crescimento na linhagem sem adição de GC7 (Figura 14). Ao analisar-se a inibição por GC7, a

concentração de 130 μM de metionina resultou em uma maior redução do rendimento celular (Figura 14) e foi selecionada para testes futuros. A linhagem complementada por PvDHS não cresceu quando 130 μM de metionina foi adicionado ao meio de cultura, assim 7,5 μM de metionina foi selecionado para controle da expressão gênica e futuro teste de inibidores, devido à redução na capacidade de carga das células tratadas por GC7 (Figura 15).

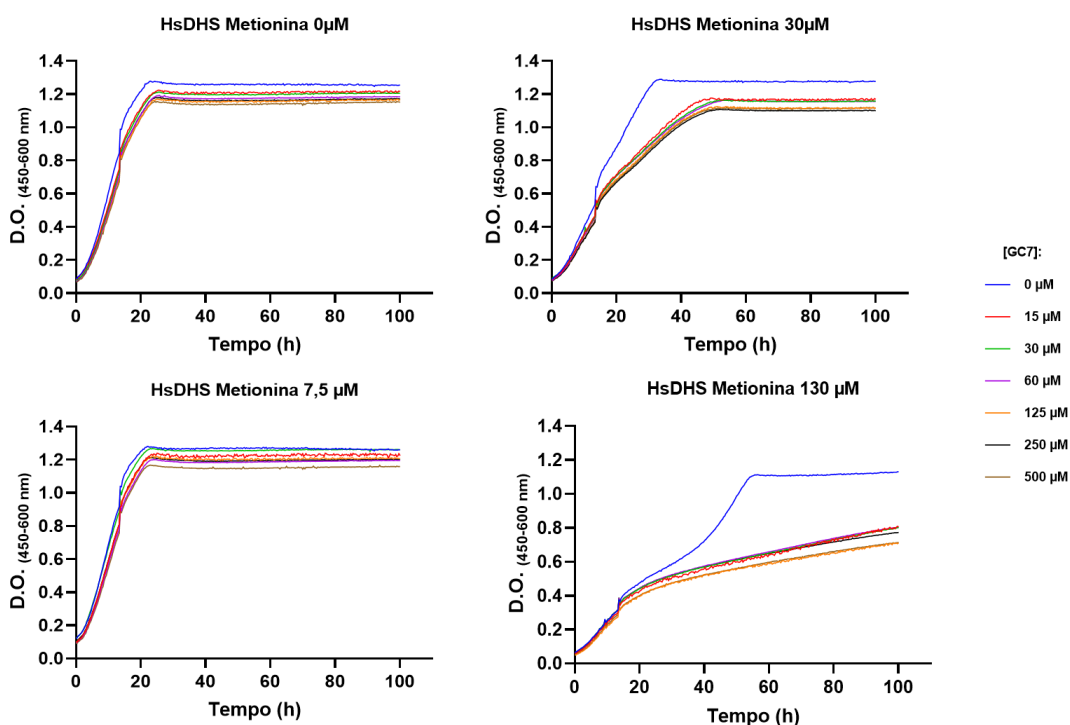


Figura 14. Análise da inibição do crescimento por GC7 das linhagens de levedura *dys1Δ* complementada por diferentes níveis de expressão de HsDHS. Comparação da inibição causada por diferentes concentrações de GC7 (indicadas na figura) nas leveduras *dys1Δ* complementadas por *H. sapiens* (SFS04, Tabela 2), por ensaio de absorbância. A concentração de metionina usada para regulação da expressão está indicada na figura.

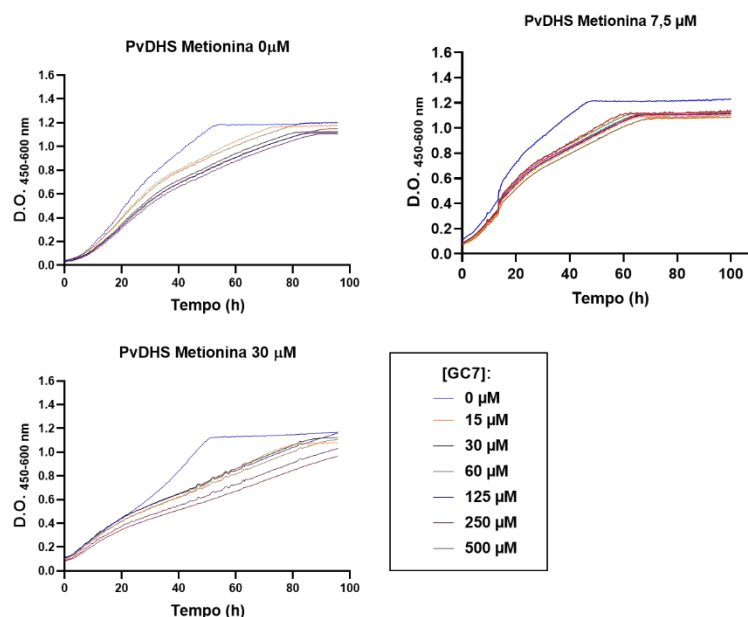


Figura 15. Análise da inibição do crescimento por GC7 das linhagens de levedura *dys1Δ* complementada por diferentes níveis de expressão de PvDHS. Comparação da inibição causada por diferentes concentrações de GC7 (indicadas na figura) nas leveduras *dys1Δ* complementadas por *P. vivax* (SFS05, Tabela 2), por ensaio de absorvância. A concentração de metionina usada para regulação da expressão está indicada na figura.

As linhagens da primeira versão da plataforma necessitavam de 1 mM de GC7 para terem seu crescimento reduzido (Figura 11), já as da segunda versão da plataforma foram inibidas por concentrações a partir de 15 μ M de GC7 (Figuras 14 e 15), o que indica que a redução dos níveis de expressão de DHS facilitou a inibição por GC7. Um novo teste de redução de crescimento das linhagens pelo GC7 foi realizado por fluorescência (Figura 16), nas concentrações de metionina selecionadas (130 μ M para HsDHS e 7,5 μ M para PvDHS; Figuras 14 e 15). Nota-se que o ensaio de fluorescência foi mais sensível e a separação das curvas é mais proeminente por esse método de detecção (Figura 16).

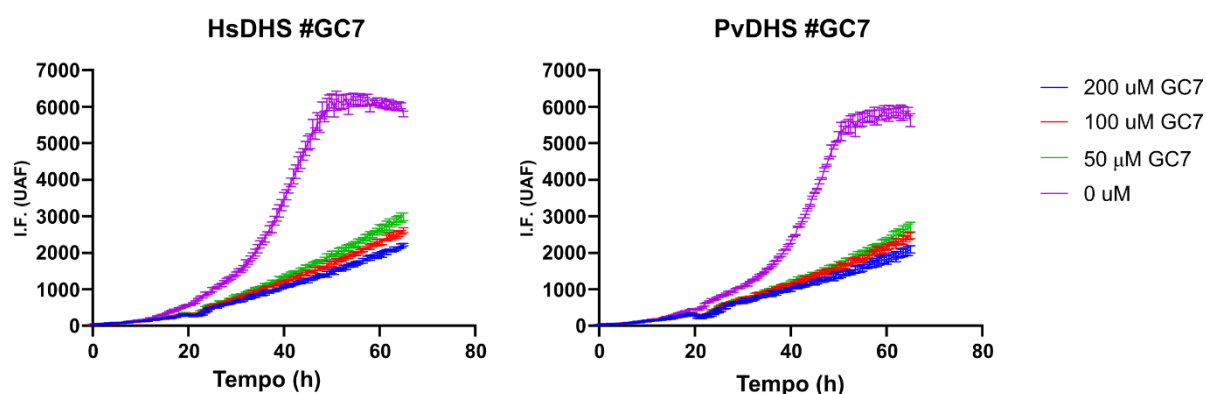


Figura 16. Análise da inibição do crescimento por GC7 em HsDHS e PvDHS. Curva de crescimento por fluorescência usando diferentes concentrações de GC7 (indicadas na figura) nas leveduras *dys1Δ* complementadas por *H. sapiens* (SFS04, Tabela 2) e *P. vivax* (SFS05, Tabela 2). A concentração de metionina usada para regulação da expressão de HsDHS foi de 130 μ M para HDHS e 7,5 μ M para PvDHS.

Com relação a DHS de *L. major*, utilizando a linhagem SFS06 (Tabela 2), que não possui promotores que permitam a redução da expressão de LmDHS, não houve redução do crescimento usando as concentrações de GC7 testadas (Figura 17). Devido ao tempo limitado para a realização do estágio no exterior e para garantir a realização do rastreamento de inibidores de DHS de *L. major*, foi utilizada a linhagem VZL1474 (Tabela 2), com a expressão de DHS sob controle de promotor *Tet-Off*. Esse promotor se encontra constitutivamente ativo, no entanto, é possível reprimir a expressão gênica pela adição de doxiciclina no meio de cultura (BILSLAND et al., 2016b; GARÍ et al., 1997). Em concentrações maiores que 2 μ g/mL a linhagem complementada por LmDHS não cresceu (Figura 18A), o que indica que necessita de maiores níveis de expressão da proteína para a complementação funcional. Nas concentrações de 0,25 a 1,0 μ g/mL de doxiciclina o crescimento da linhagem e a inibição por GC7 não variaram muito, porém o uso de 0,25 μ g/mL de doxiciclina foi selecionado para teste de inibidores contra LmDHS (Figura 18B), devido a uma ligeira melhoria na visualização de dose-resposta.

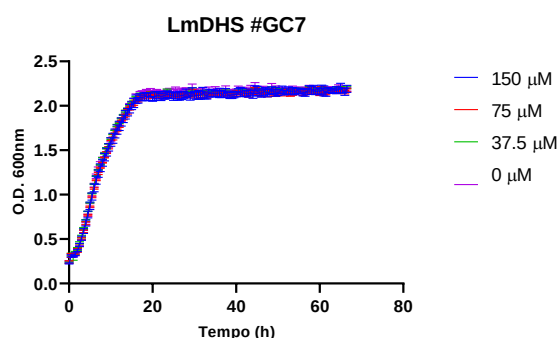


Figura 17. Teste da inibição do crescimento por GC7 em LmDHS. Curva de crescimento usando diferentes concentrações de GC7 (indicadas na figura) nas leveduras *dys1Δ* complementadas por *L. major* (SFS06, Tabela 2), por ensaio de absorvância (DO 600nm)

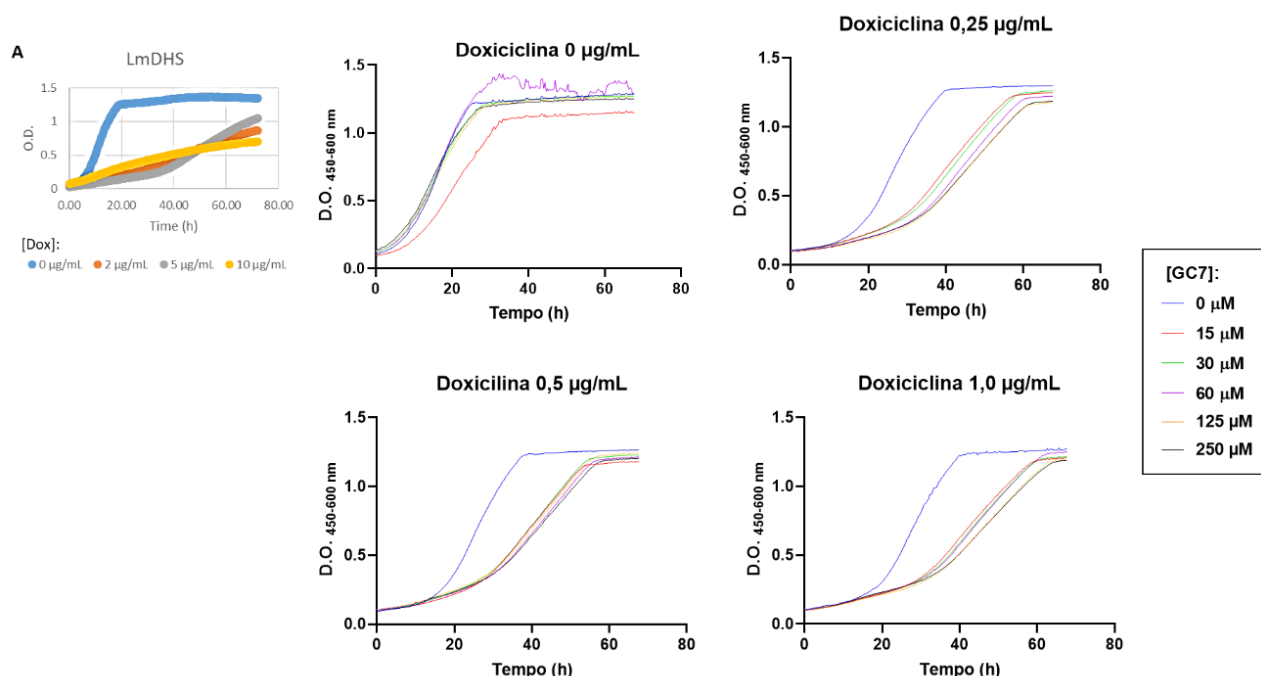


Figura 18. Análise da inibição do crescimento por GC7 das linhagens de levedura *dys1Δ* complementada por diferentes níveis de expressão de LmDHS. Comparação da inibição causada por diferentes concentrações de GC7 (indicadas na figura) nas leveduras *dys1Δ* complementadas por *L. major* (VZL1474, Tabela 2), por ensaio de absorvância. A concentração de doxiciclina usada para regulação da expressão está indicada na figura.

4.5.2. Ensaios fenotípicos utilizando robô Eve

Utilizando uma plataforma robotizada programada para ciclos de incubação, agitação e leitura das placas, foram realizados os testes de inibição dos 9 compostos selecionados pelo rastreamento *in silico* (Tabela 7) por ensaios de curva de crescimento com os valores mensurados por fluorescência para HsDHS e PvDHS

(Figuras 19 e 20, respectivamente) e por absorbância para LmDHS (Figura 21). Através das curvas de crescimento, é possível analisar visualmente a redução de crescimento das linhagens pelos hits (Figuras 19, 20 e 21). Neste ensaio *in vivo* foi possível encontrar alguns compostos com inibição seletiva para a DHS de um dos alvos, ou seja, que reduziram o crescimento diferencialmente em uma das linhagens (descritos mais adiante no texto).

Dentre os 4 compostos preditos como ligantes da DHS de *P. vivax* por triagem virtual (Tabela 7), apenas um reduziu o crescimento da linhagem complementada por PvDHS, o composto GNF-Pf-744 (Figura 19). Já entre os candidatos preditos como ligantes da DHS de *L. major* (Tabela 7), 4 compostos reduziram o crescimento da linhagem codificando PvDHS: TCMDC-124630, ZINC518875, GNF-Pf-4241 e GNF-Pf-3738 (Figura 19).

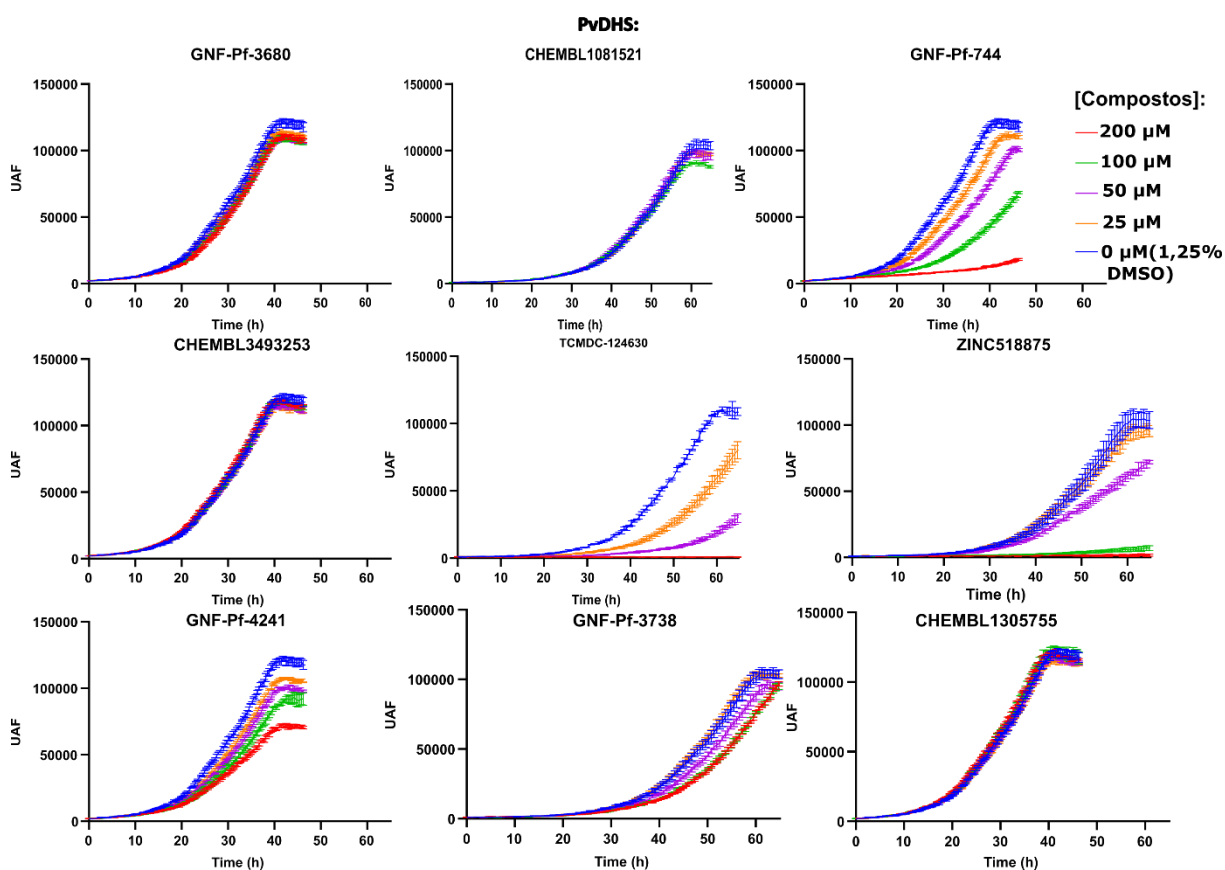


Figura 19. Análise do crescimento diferencial na linhagem de levedura complementada pela enzima DHS de *P. vivax* na presença dos hits selecionados por triagem virtual (Tabela 7). Curvas de crescimento usando diferentes concentrações de compostos (indicadas na figura) na levedura *dys1Δ* complementada por *P. vivax* (Linhagem SFS05, Tabela 2), por ensaio de fluorescência (filtro de fluorescência para *mCherry*: λ excitação 580 – 15 nm; λ emissão 620 -20 nm). Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de 4 replicatas experimentais.

Para o teste dos compostos na linhagem complementada por LmDHS, foram realizados ensaios de absorvância (D.O._{600nm}) usando 100 μ M dos compostos (Tabela 4). Os compostos TCMDC-124630, GNF-Pf-4241 e GNF-Pf-3738 (Tabela 4) também inibiram LmDHS nessa concentração, nas curvas de crescimento em *S. cerevisiae* (Figura 20). Além disso, o composto ChEMBL1081521 (Tabela 4) também reduziu o crescimento da linhagem complementada por LmDHS (Figura 20).

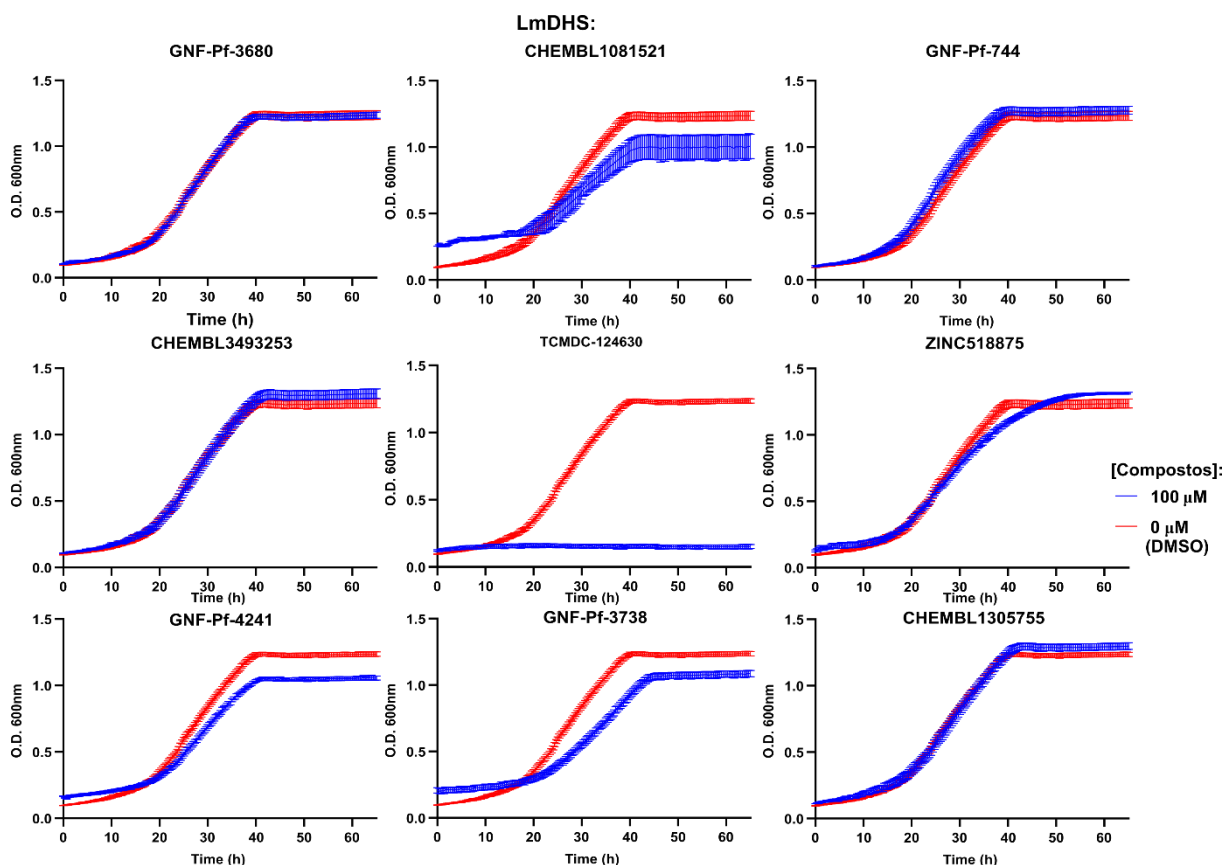


Figura 20. Análise do crescimento diferencial na linhagem de levedura complementada pela DHS de *L. major* na presença dos hits selecionados por triagem virtual (Tabela 7). Curvas de crescimento usando 100 μ M de compostos (indicadas na figura) na levedura *dys1Δ* complementada por *L. major* (VZL1474, Tabela 2), por mensuração da absorvância (D.O._{600nm}). Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de 4 replicatas experimentais.

Os compostos, ChEMBL1085121, GNF-Pf-744, TCMDC-124630, ZINC518875, GNF-Pf-4241 e GNF-Pf-3738, que inibiram PvDHS e/ou LmDHS, foram também testados na linhagem complementada por HsDHS (SFS04, Tabela 2) (Figura 21) e na linhagem selvagem de mesmo *background* genético (SFS01, Tabela 2) (Figura 22). Analisando visualmente, observa-se que os compostos ChEMBL1085121 e GNF-Pf-744 inibiram mais LmDHS (Figura 20) e PvDHS (Figura 19), respectivamente, em comparação às outras espécies (Figuras 21 e 22). A molécula GNF-Pf-3738,

visualmente, também reduziu mais o crescimento de PvdHS (Figura 19) e LmDHS (Figura 20) em comparação com as demais linhagens testadas (Figuras 21 e 22).

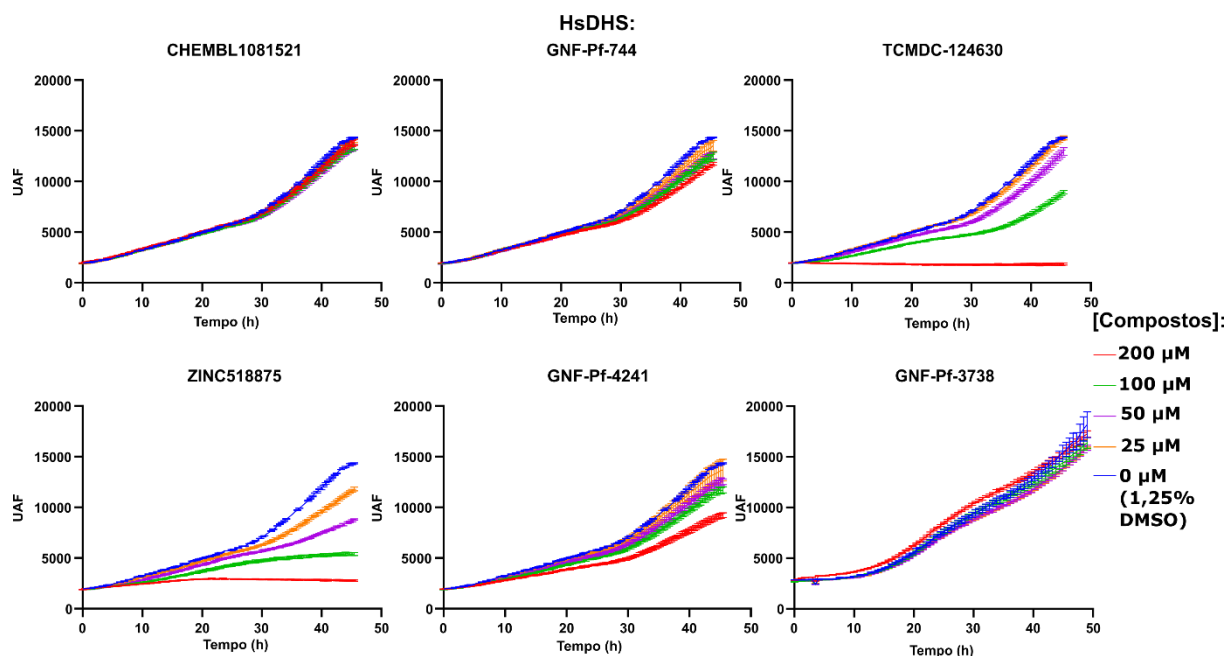


Figura 21. Curva de crescimento da linhagem de levedura complementada pela DHS de *H. sapiens* na presença dos hits selecionados por triagem virtual (Tabela 7). Curvas de crescimento usando diferentes concentrações de compostos (indicadas na figura) na levedura *dys1Δ* complementada por *H. sapiens* (SFS04, Tabela 2), por ensaio de fluorescência (filtro de fluorescência para *Sapphire*: $\lambda_{\text{excitação}}$ 390 – 15 nm; $\lambda_{\text{emissão}}$ 510 -20 nm). Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de 4 replicatas experimentais.

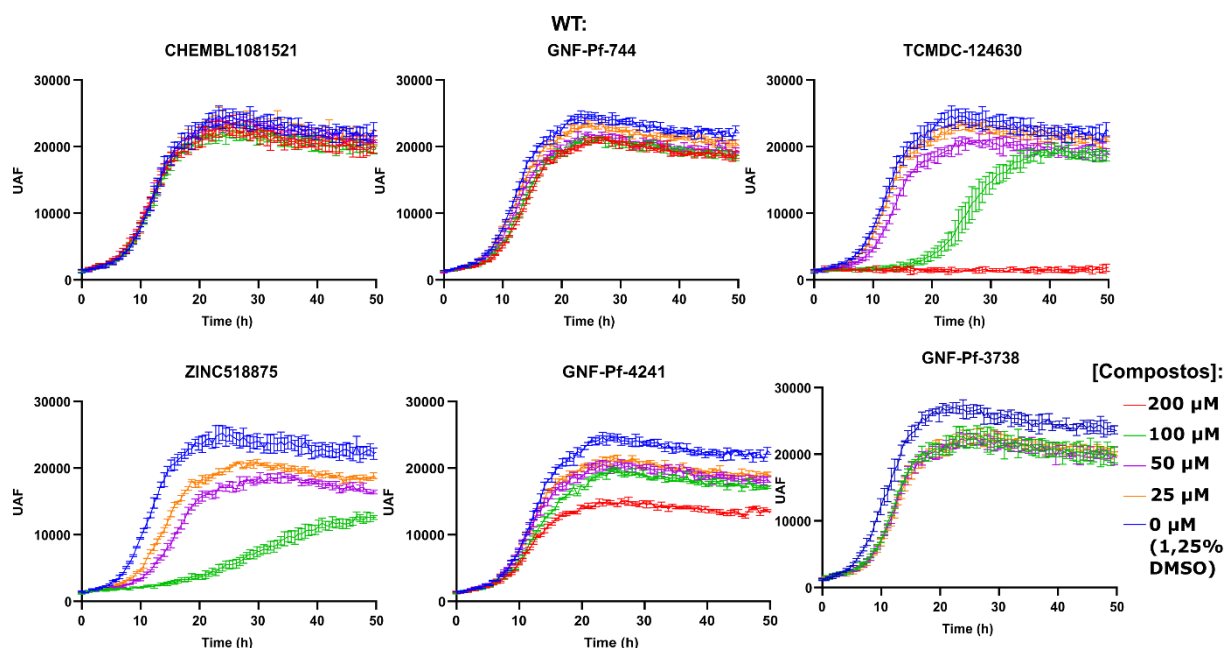


Figura 22. Curvas de crescimento da linhagem de levedura selvagem (WT) na presença dos hits selecionados por triagem virtual (Tabela 7). Curvas de crescimento usando diferentes concentrações de compostos (indicadas na figura) na levedura selvagem de mesmo *background* genético (SFS01, Tabela 2), por ensaio de fluorescência (filtro de fluorescência para *mCherry*: λexcitação 580 – 15 nm; λemissão 620 -20 nm). Cada ponto representa a média ± desvio padrão de 4 replicatas experimentais.

Para efetuar uma análise mais detalhada das curvas de crescimento, diversos parâmetros métricos de cada curva de crescimento foram extraídos utilizando análises no software R, tais como: tamanho inicial da população, taxa de crescimento, capacidade de carga e a área sob a curva logística. Após analisar todos os parâmetros, a área sob a curva foi mais representativa e foi selecionada para comparar as curvas das condições em que houve tratamento com diferentes concentrações de compostos e com o controle de solvente (DMSO). A área sob a curva integra informações sobre o tamanho inicial da população, taxa de crescimento e capacidade de carga, em um único valor (HASENBRINK et al., 2005; SPROUFFSKE; WAGNER, 2016).

De acordo com o crescimento relativo obtido comparando a área sob a curva do composto em relação a do solvente, a molécula GNF-Pf-744 (Tabela 4) apresentou dose-resposta para a inibição de PvdHS, reduzindo 95% do crescimento a 200 μM, 65% a 100 μM, 30% a 50 μM e 13% usando 25 μM do composto ($p < 0,01$, barras azuis, Figura 23A). A redução do crescimento de HsdHS por essa molécula não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (barras vermelhas, Figura 23A) e, por fim,

GNF-Pf-744 reduziu apenas 17% do crescimento da linhagem selvagem usando 200 μ M do composto (barras verdes, Figura 23A).

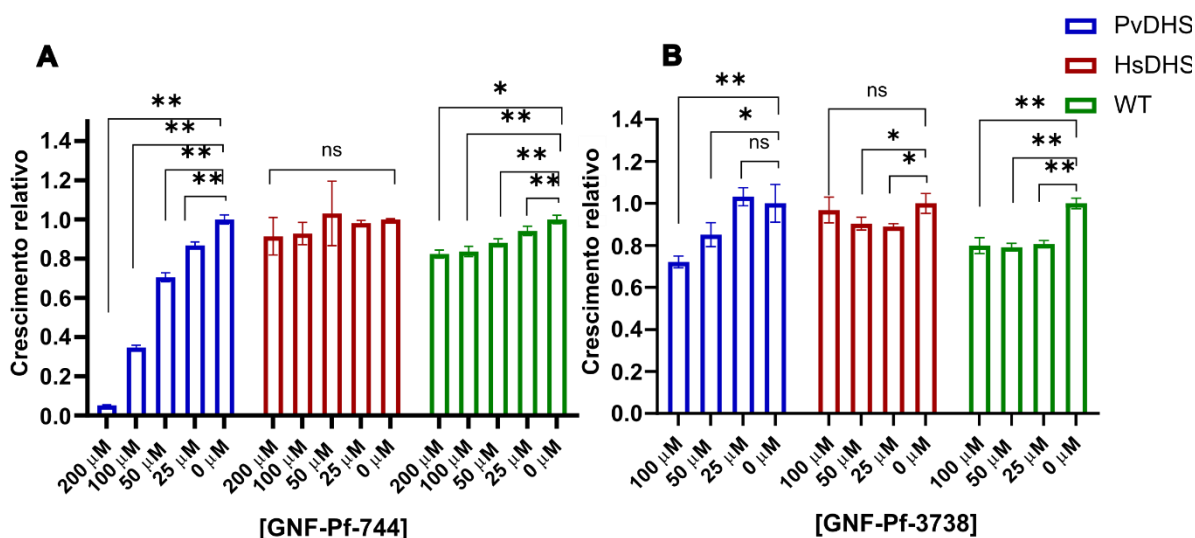


Figura 23. Crescimento relativo das cepas *dys1Δ* de *S. cerevisiae* complementadas por PvDHS, HsDHS e da linhagem selvagem na presença de GNF-Pf-744 e GNF-Pf-3738. As barras mostram o score de crescimento relativo, calculado através da área sob a curva relativa, das cepas *dys1Δ* de *S. cerevisiae* complementadas pelas enzimas DHS indicadas e o score de crescimento relativo da linhagem selvagem isogênica VZL1462 (ScDHS - Tabela 2) na presença de 25, 50, 100 ou 200 μ M de GNF-Pf-744 (Tabela 4) e de 25, 50 ou 100 μ M de GNF-Pf-3738 (Tabela 2). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas por teste t-Student, entre o crescimento individual das cepas na presença de compostos ou do solvente (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

O crescimento relativo na presença de GNF-Pf-3738 (Tabela 2) foi comparado apenas para as concentrações de 25 até 100 μ M (Figura 23 B), uma vez que não houve diferença nos scores para as concentrações de 100 e 200 μ M para nenhuma das cepas. Nas concentrações de 50 e 100 μ M, a molécula reduziu 14 ($p < 0,05$) e 27% ($p < 0,01$) do crescimento de PvDHS (barras azuis, Figura 23B). Para HsDHS, as concentrações de 25 e 50 μ M reduziram aproximadamente 10% do crescimento, mas não houve dose-resposta (barras vermelhas, Figura 23B) e na linhagem selvagem, todas as concentrações testadas inibiram 20%, mas também não houve dose-reposta da inibição por esse composto (barras verdes, Figura 23B). Os compostos TCMDC-124630, ZINC518875 e GNF-Pf-4241 reduziram o crescimento de todas as linhagens na mesma extensão, como observado visualmente (Figuras 19-22).

Os compostos ChEMBL1081521 e GNF-Pf-3738 (Tabela 4) reduziram 37 e 33% a uma concentração de 100 μ M, respectivamente, do crescimento da linhagem

complementada por LmDHS (VZL1474, Tabela 2) (Figura 24). Não foram realizadas comparações com os parâmetros de crescimento obtidos para as curvas das linhagens HsDHS e WT, pois essas possuem diferente *background* genético e os dados foram obtidos por fluorescência, enquanto que para LmDHS os valores obtidos foram por absorbância.

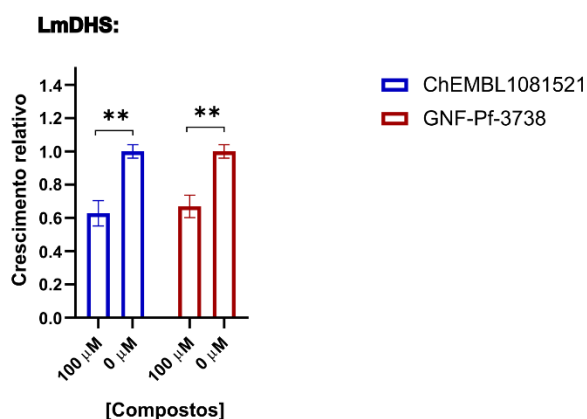


Figura 24. Crescimento relativo da cepa *dys1Δ* complementada por LmDHS na presença dos compostos ChEMBL1081521 e GNF-Pf-3738. As barras mostram o score de crescimento relativo, calculada através da área sob a curva relativa, da cepa *dys1Δ* de *S. cerevisiae* complementada pela enzima LmDHS (VZL1474 - Tabela 2) na presença de 100 μM dos compostos ChEMBL1081521 e GNF-Pf-3738 (Tabela 4). Dois asteriscos (**) indicam diferenças estatisticamente significativas (teste t-Student $p < 0,01$) entre o score do crescimento na presença ou ausência dos compostos.

4.5.2.1. Rastreamento *in vivo* da coleção de moléculas *Pathogen box* na linhagem complementada por PvDHS

Ainda, utilizando o ensaio fenotípico robotizado para testar o efeito de compostos no crescimento da linhagem nocaute de *DYS1* complementada por PvDHS (SFS05, Tabela 2), foi realizado o rastreamento de 400 compostos da coleção de pequenas moléculas *Pathogen box* (*Medicines for Malaria Venture*) a uma concentração de 25 μM. A grande maioria dos compostos não afetou o crescimento das linhagens em relação à condição controle (somente solvente). Apenas 48 compostos (12% do total de moléculas da coleção) reduziram o crescimento da linhagem complementada por PvDHS em relação ao controle de solvente e, dentre esses, apenas 16 estavam disponíveis comercialmente para futuros testes confirmatórios da inibição (Figuras 25 e 26), sendo eles: MMV001499, MMV016838, MMV202458, MMV202553, MMV676382, MMV676389, MMV676409, MMV676431,

MMV676555, MMV676584, MMV688553, MMV688773, MMV688795, MMV688958 e MMV688991.

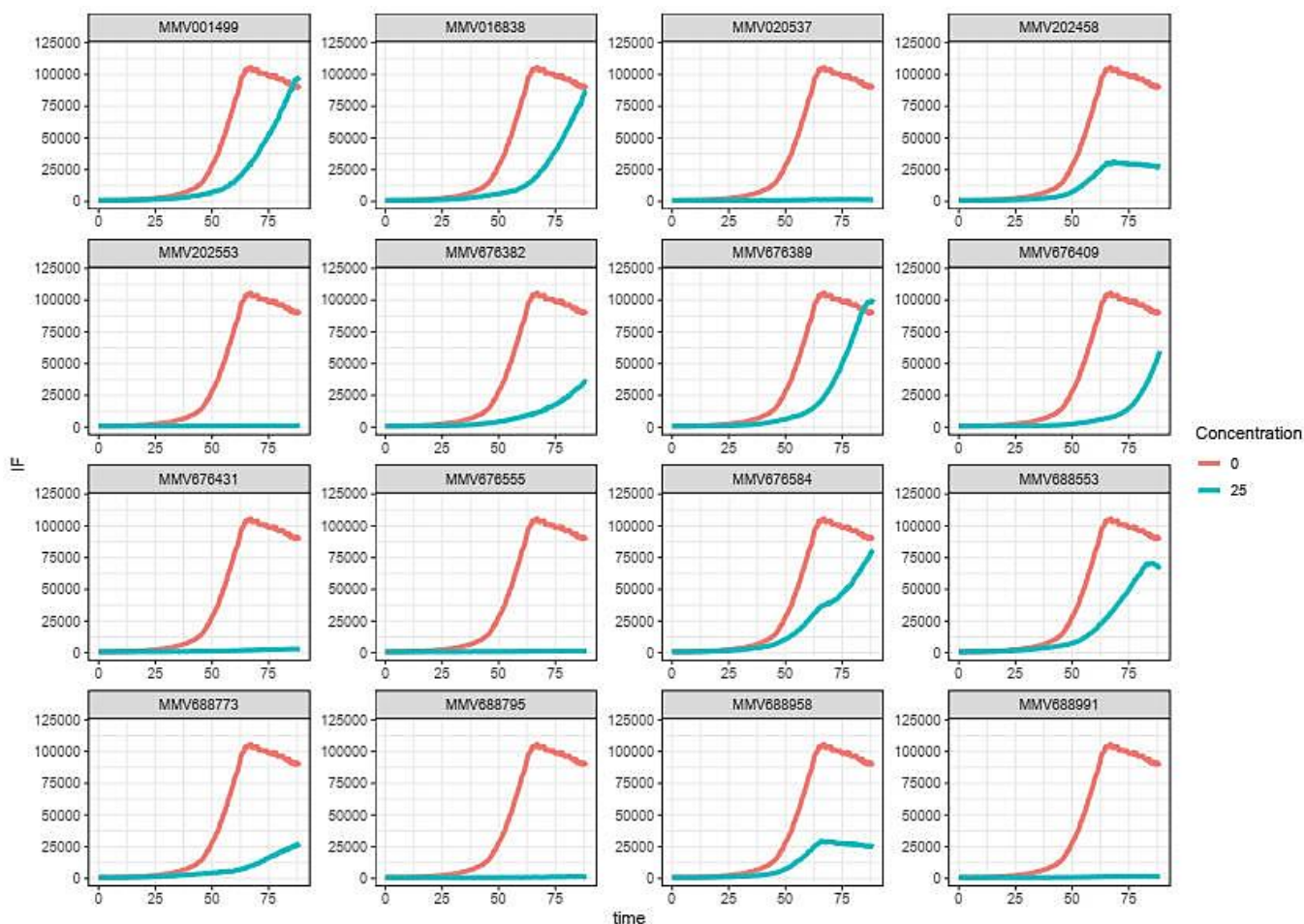


Figura 25. Curvas de crescimento da cepa *dys1Δ::PvDHS* na presença de compostos da coleção *Pathogen box*. Curvas de crescimento usando 25 μM de diferentes compostos (indicadas na figura) da coleção *Pathogen box* na linhagem SFS05 (Tabela 2), por ensaio de fluorescência (filtro de fluorescência para *mCherry*: λexcitação 580 – 15 nm; λemissão 620 -20 nm). As curvas em rosa indicam a condição controle de solvente (DMSO). Cada ponto representa a média de 4 replicatas experimentais.

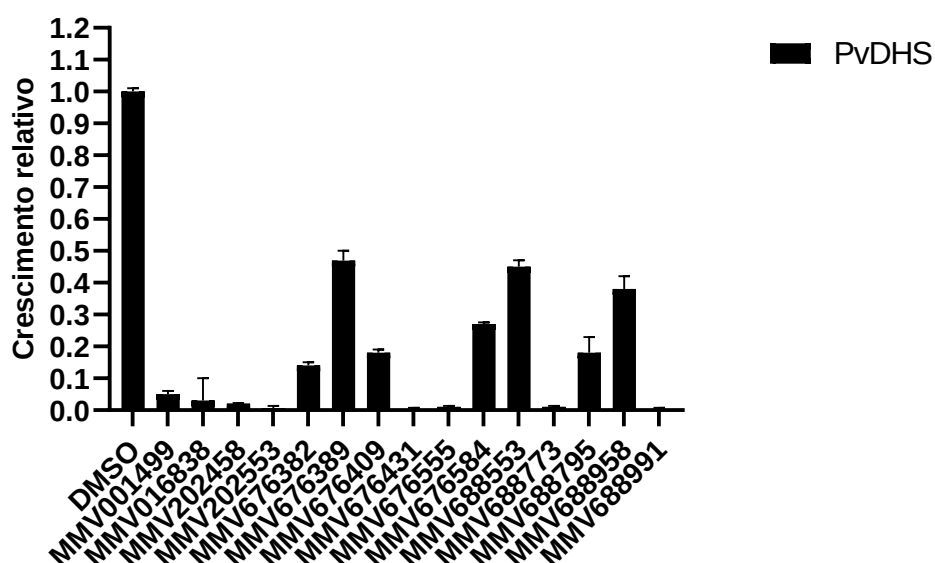


Figura 26. Crescimento relativo da cepa *dys1Δ* complementada por PvDHS na presença dos inibidores da coleção *Pathogen box*. As barras mostram o score de crescimento relativo, calculada através da área sob a curva relativa), na presença de 25 μ M de diferentes compostos (nomes indicados na figura). O crescimento relativo foi calculado pela seguinte fórmula: crescimento relativo = (AUC composto / AUC DMSO).

Dentre os 16 inibidores da linhagem complementada por PvDHS (Figuras 25 e 26), 15 foram testados, exceção de MMV676389 por limitação do reagente, quanto a seletividade da inibição em comparação com a linhagem complementada por HsDHS e na linhagem selvagem (SFS04 e SFS01, respectivamente) (Figuras 27 e 28). No entanto, 7 compostos: MMMV001499, MMV202458, MMV676431, MMV676555, MMV688553, MMV688795 e MMV688958, interferiram com o output de fluorescência em pelo menos uma das linhagens (Figuras 27 e 28), obtendo valores de fluorescência maiores que o obtido para a linhagem tratada com DMSO, o que dificultou a análise dos parâmetros da curva de crescimento nessas linhagens e consequentemente a análise da seletividade dos compostos.

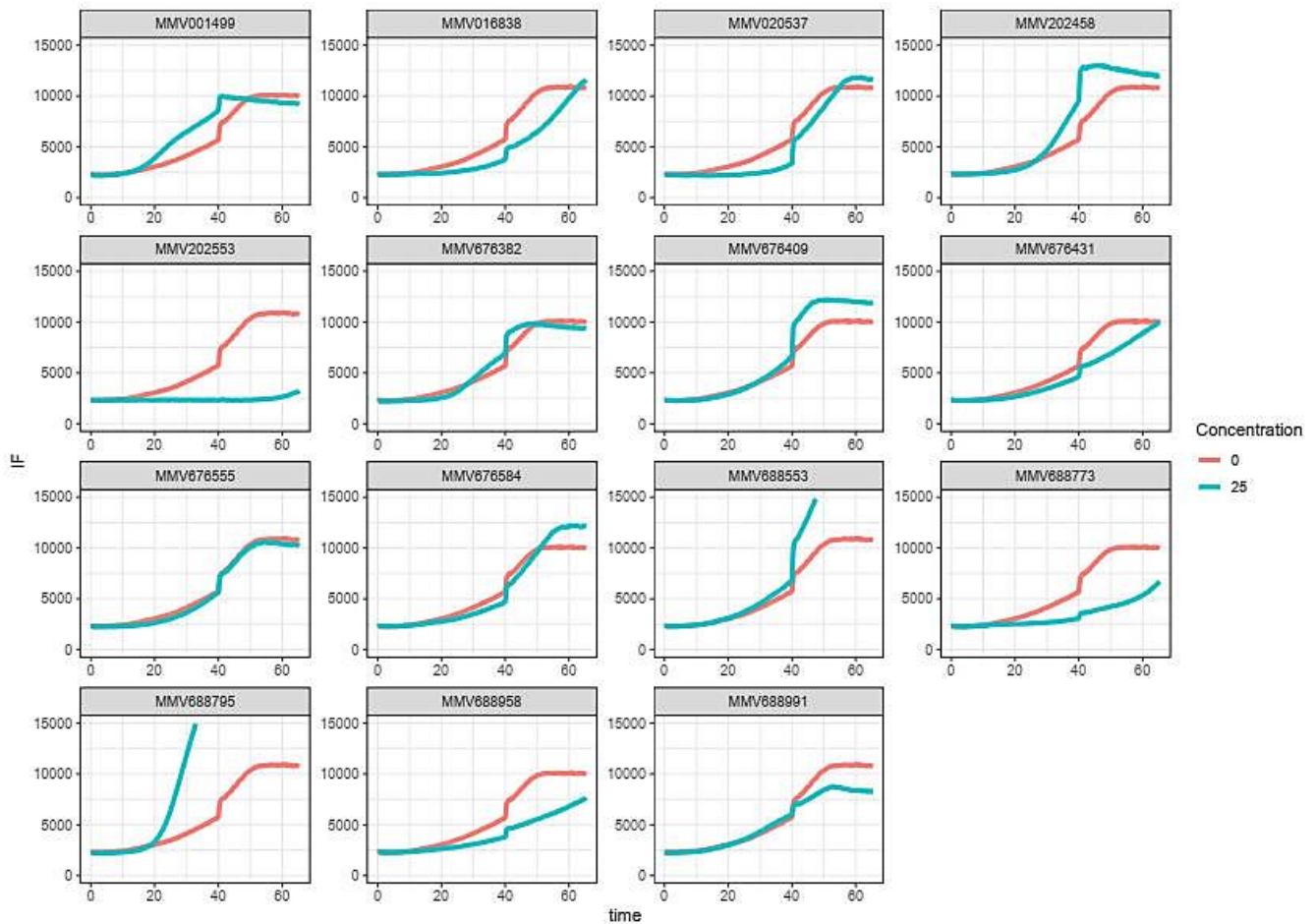


Figura 27. Curvas de crescimento da cepa *dys1Δ::HsDHS* na presença de compostos da coleção *Pathogen box*. Curvas de crescimento usando 25 μM de diferentes compostos (indicadas na figura) da coleção *Pathogen box* na linhagem SFS04 (Tabela 2), por ensaio de fluorescência (filtro de fluorescência para *Sapphire*: λexcitação 390 – 15 nm; λemissão 510 -20 nm). As curvas em rosa indicam a condição controle de solvente (DMSO). Cada ponto representa a média de 4 replicatas experimentais.

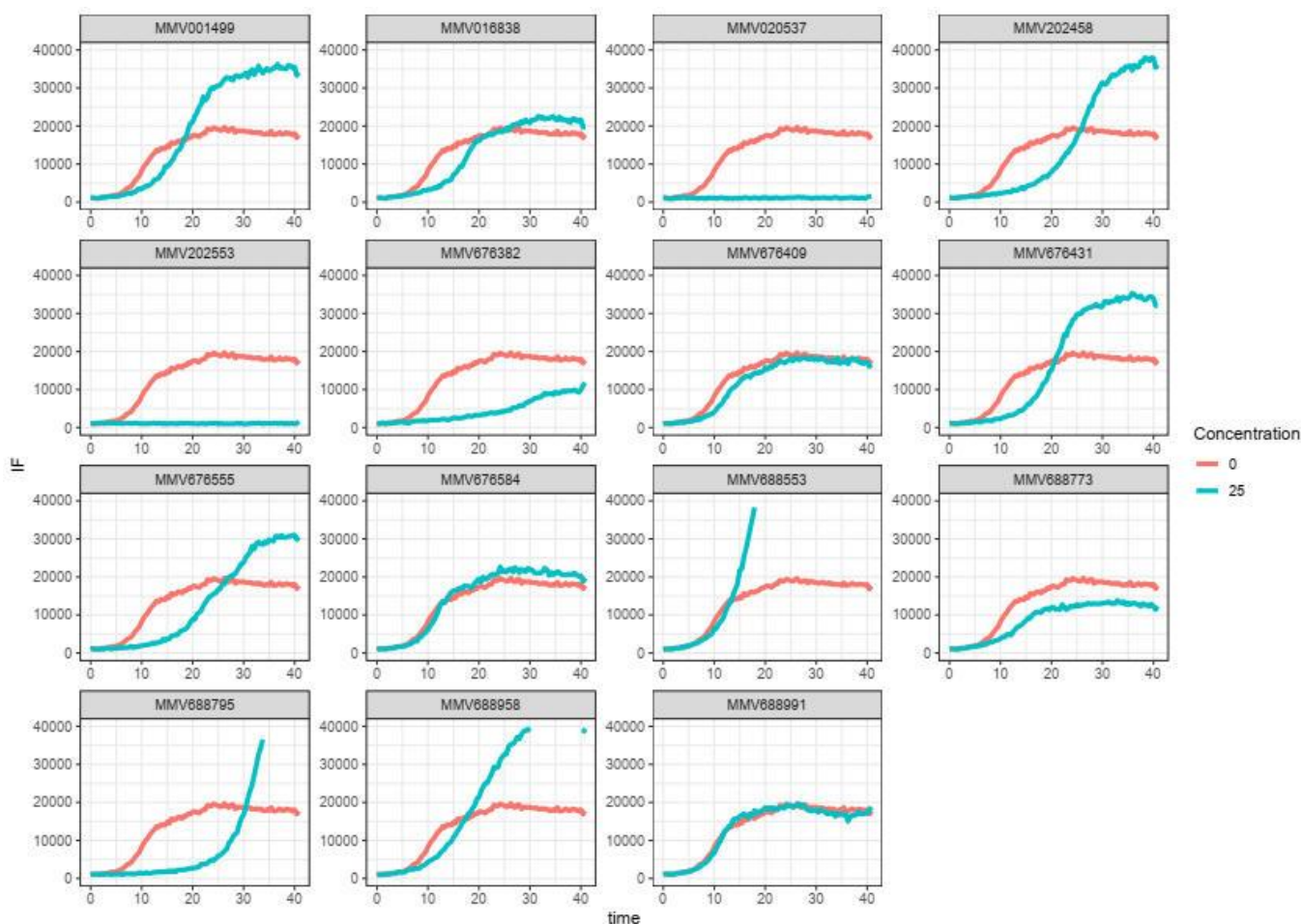
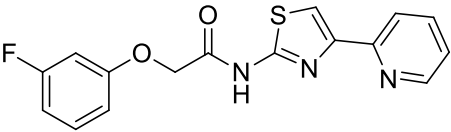
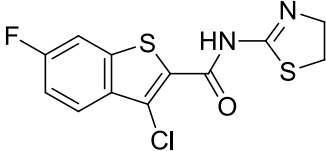
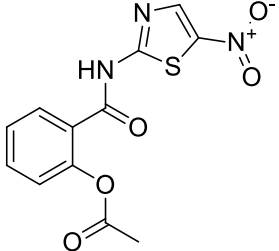


Figura 28. Curvas de crescimento da linhagem de levedura selvagem (WT) na presença de compostos da coleção *Pathogen box*. Curvas de crescimento usando 25 µM de diferentes compostos (indicadas na figura) da coleção *Pathogen box* na linhagem WT (Tabela 2), por ensaio de fluorescência (filtro de fluorescência para *mCherry*: λexcitação 580 – 15 nm; λemissão 620 -20 nm). As curvas em rosa indicam a condição controle de solvente (DMSO). Cada ponto representa a média de 4 replicatas experimentais.

Como esse ensaio foi realizado apenas uma vez, não foi possível a adição de poços controles contendo apenas os compostos e meio de cultura, e da realização dos ajustes necessários para que o ensaio em larga escala ocorra de maneira mais eficiente. Apesar disso, através desse rastreamento, podemos observar que os compostos MMV020537, MMV202553, MMV676382 e MMV688773 também inibiram o crescimento da linhagem selvagem (Figura 28), sendo provavelmente apenas compostos citotóxicos. Por outro lado, os compostos MMV676409, MMV676584 e MMV688991 (Tabela 8) foram seletivos à inibição de crescimento da linhagem substituída por PvDHS (SFS05, Tabela 2) (Figura 25) em comparação com a linhagem selvagem de mesmo *background* genético (SFS01, Tabela 2) (Figura 28).

Tabela 8. Compostos que foram seletivos à inibição de PvDHS na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura 2D
MMV676409	
MMV676584	
MMV688991	

Dentre os compostos que inibiram PvDHS (Figura 25), novos estoques dos compostos MMV688553 e MMV676584 foram adquiridos e preparados a partir de pó e apenas o composto MMV676584 confirmou sua inibição para PvDHS e apresentou dose-resposta nas concentrações entre 50 e 200 μ M (Figura 29). No entanto, esse composto havia inibido aproximadamente 70% do crescimento da linhagem de PvDHS em relação ao controle (Figura 25) e nos resultados obtidos com o novo reagente, MMV676584 reduziu 30% do crescimento da cepa a 200 μ M, por outro lado, a inibição foi de apenas 12% na linhagem complementada por HsDHS (Figura 29C).

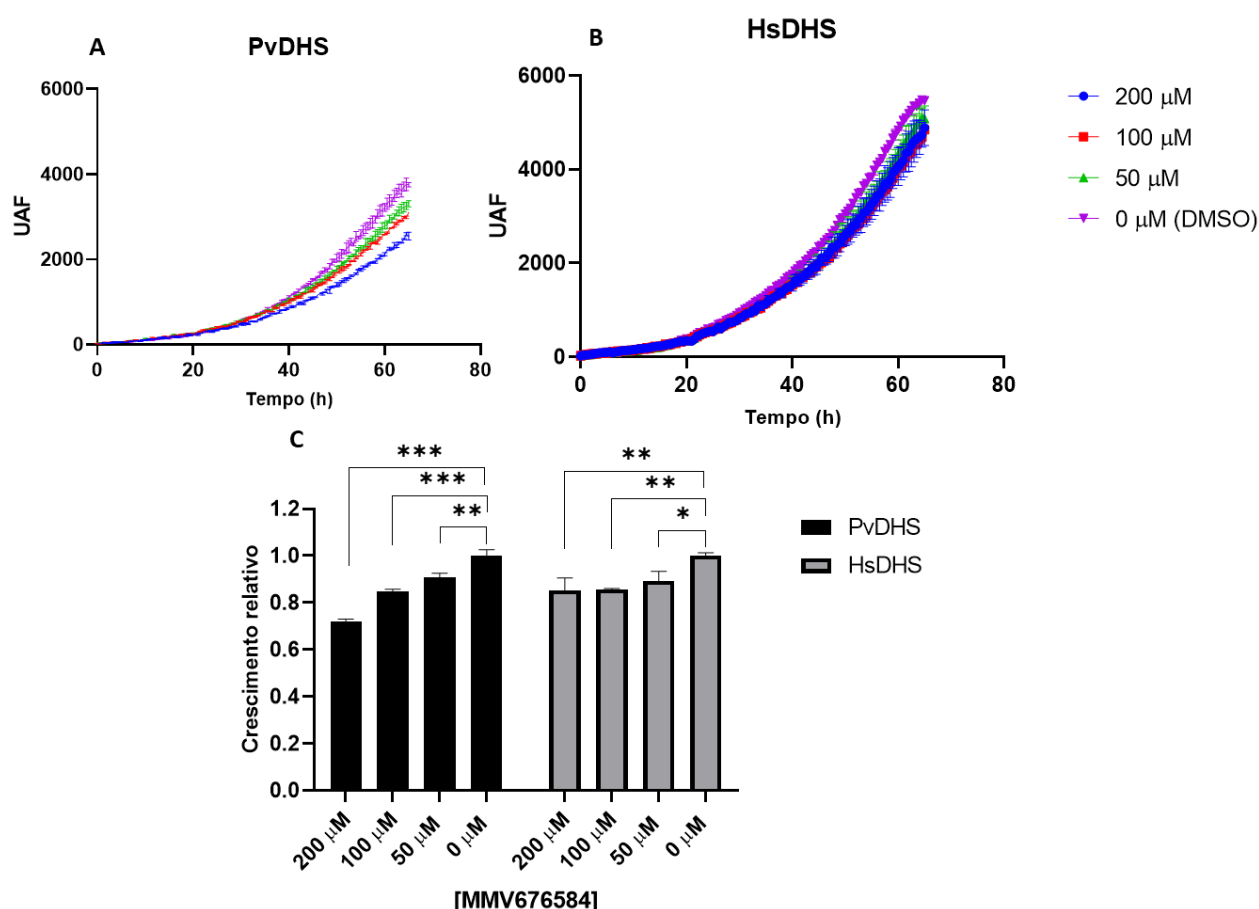


Figura 29. Crescimento relativo das linhagens complementadas por PvDHS e HsDHS na presença do composto MMV676584 (Tabela 8). Curvas de crescimento usando diferentes concentrações de MMV676584 (indicadas na figura) na linhagem *dys1Δ::PvDHS* (A) (Tabela 2) e *dys1Δ::HsDHS* (B) (Tabela 2), por ensaio de fluorescência. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de 4 replicatas experimentais. (C) Score de crescimento relativo, calculada pela curva com o composto em relação à curva de DMSO. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas por teste t-Student, entre o crescimento individual das cepas na presença de compostos ou do solvente (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Como demonstrado pelos resultados aqui obtidos, quando realizado todos os controles necessários, a plataforma de substituição em *S. cerevisiae* constitui uma alternativa para ensaios fenotípicos em rastreamento de pequenas moléculas em larga escala, uma vez que se mostrou capaz de diferenciar a sensibilidade de um alvo ao composto químico, além de ser realizado em um contexto celular (DENNY; STEEL, 2015).

4.5.3. Avaliação da taxa de hipusinação das linhagens tratadas com metionina ou compostos químicos

Como já citado ao longo do texto, a função essencial de DHS está diretamente relacionada ao seu requerimento na hipusinação (PARK; WOLFF, 2018a; SILVA et al., 2020). Assim, também testamos a hipusinação de eIF5A de *S. cerevisiae* pelas enzimas DHS de *H. sapiens* e *P. vivax* (Figura 30) dessa nova versão de linhagens complementadas contendo as ORFs de DHS integradas no genoma. Foi utilizado um anticorpo direcionado ao reconhecimento do resíduo de hipusina (eIF5A hipusinado, Figura 30) e um capaz de reconhecer eIF5A modificado e não modificado (eIF5A total, Figura 30). As linhagens complementadas demonstraram hipusinação de eIF5A (Figura 30). Em ensaio com o anticorpo anti-Dys1 de *S. cerevisiae* também ficou demonstrada a deleção da DHS endógena (Anti-Dys (ScDHS), Figura 30). A padronização do ensaio para LmDHS não obteve sucesso, até o momento, e ainda estamos buscando tempos e concentrações adequadas de tratamento com doxicilina (para redução nos níveis de LmDHS sendo expressos) para finalização dos testes com essa proteína (dados não mostrados).

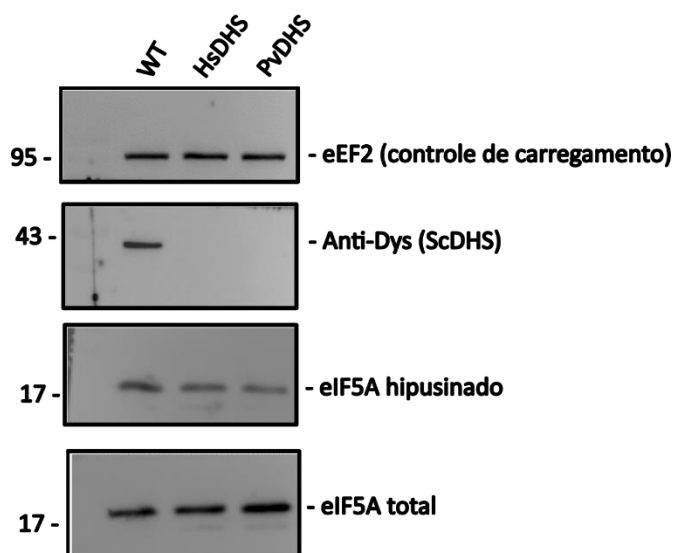


Figura 30. Hipusinação da eIF5A de levedura por linhagens complementadas com DHS de *H. sapiens* e *P. vivax*. Detecção por *western blot* de eIF5A hipusinado e eIF5A total das linhagens selvagem (WT) complementadas por HsDHS e PvdHS. O anticorpo anti-dys1 de levedura (Anti-Dys (ScDHS)) também foi utilizado para mostrar a deleção do gene endógeno nas linhagens substituídas por HsDHS e PvdHS.

Para comparar o efeito da redução da expressão das DHSs de *P. vivax* e *H. sapiens* na taxa de hipusinação das linhagens complementadas, mediada pela redução do promotor de *MET3* ao adicionar metionina no meio de cultura, analisou-se o crescimento dessas linhagens adicionando diferentes concentrações de metionina em um tratamento de 10 horas. A linhagem nocaute de *DYS1* expressando HsDHS foi analisada quanto ao seu crescimento quando adicionados 0, 60 e 130 μM de metionina, enquanto que para PvDHS, 0 e 7,5 μM de metionina foram testados na redução da expressão gênica (Figura 31A).

De acordo com esse ensaio, o nível de hipusinação da linhagem complementada por PvDHS (aproximadamente 40%, 0 μM de metionina) é inferior ao de HsDHS (aproximadamente 60%, 0 μM de metionina), no entanto os níveis de hipusinação entre as linhagens se equiparam quando a expressão de HsDHS é regulada pela adição de 130 μM de metionina (Figura 31A e B). Assim, a condição de crescimento das pré-culturas estabelecidas para esse ensaio para o tratamento dos inibidores encontrados por rastreamento em levedura foram de 130 μM de metionina para HsDHS e 0 μM de metionina para PvDHS.

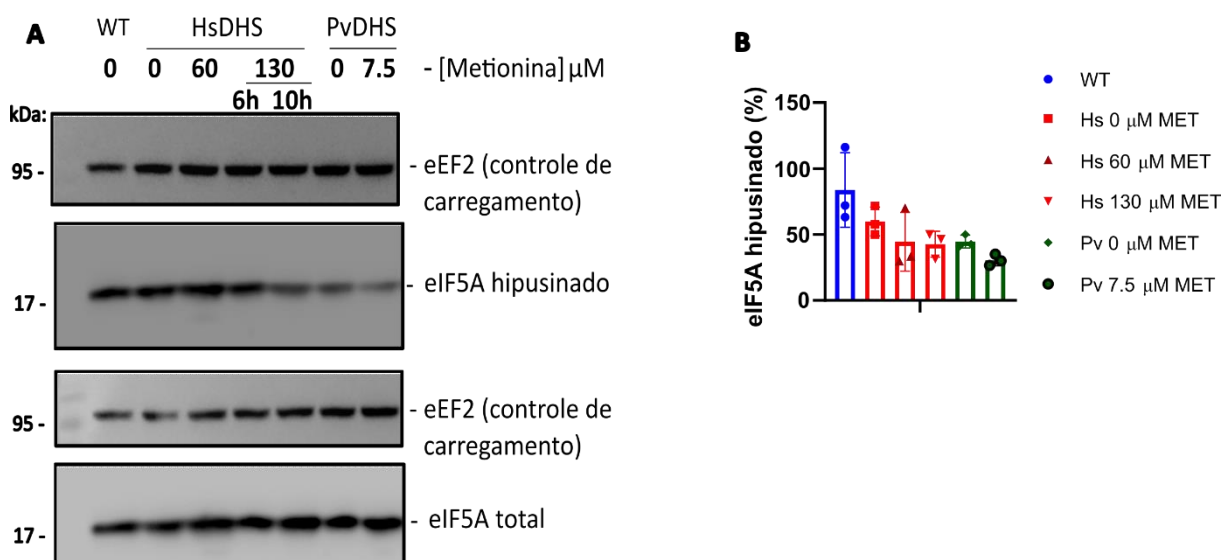


Figura 31. Hipusinação de eIF5A ao reprimir a expressão de DHS com diferentes concentrações de metionina. (A) Detecção por *western blot* dos níveis de hipusinação após 10 horas de tratamento com metionina (concentrações indicadas na figura). (B) Gráfico reportando a porcentagem de eIF5A hipusinado (eIF5A hipusinado/ eIF5A total *100) nas condições indicadas na figura. As barras representam média $\pm$ desvio padrão (n=3) da porcentagem de eIF5A hipusinado.

Antes de testar os *hits*, foi realizada uma padronização usando GC7 (12 horas de tratamento) para verificar a sensibilidade do ensaio em detectar a inibição da hipusinação nas condições de ensaio estabelecidas (Figura 32). Como demonstrado na Figura 32, o ensaio foi capaz de detectar a redução nos níveis de hipusinação em HsDHS e PvDHS por GC7 (Figura 32A e B). Em HsDHS, a diferença nos valores de hipusinação entre as condições com e sem GC7 só foi estatisticamente significativa quando a expressão de DHS foi reduzida pela adição de 130 μ M de metionina (Figura 32B).

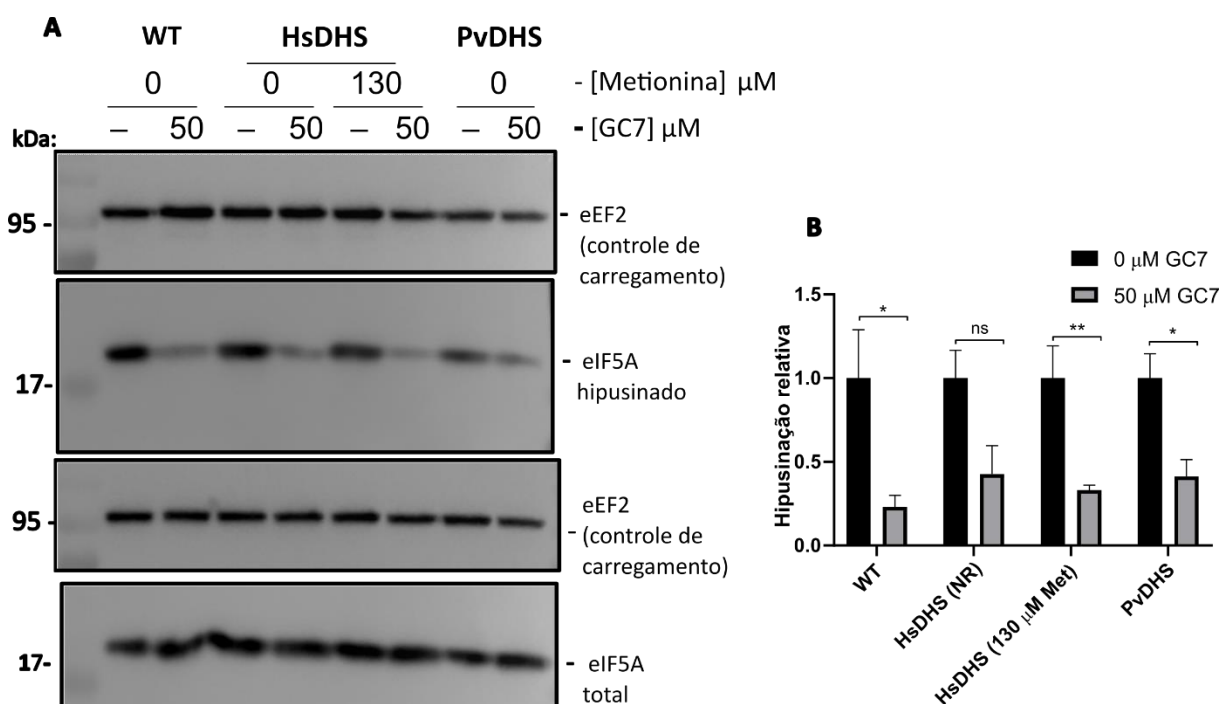


Figura 32. Hipusinação de eIF5A na presença de GC7. (A) Detecção por *western blot* dos níveis de hipusinação após 12 horas de tratamento com 50 μ M de GC7 nas cepas selvagem (WT) e complementadas por PvDHS e HsDHS. As concentrações de metionina utilizadas nas pré-culturas (como mencionado em Material e Métodos) estão indicados na figura. (B) Gráfico reportando a razão entre eIF5A hipusinado e eIF5A total nas condições indicadas na figura. As barras representam média dos valores de hipusinação relativa ((eIF5A hipusinado/ eEF2) / eIF5A total/ eEF2)) $\pm$ desvio padrão (n=3). Foi realizado um teste t-Student comparando a condição com composto e a condição controle de solvente em que um asterisco (*) indica que as diferenças são significantes estatisticamente com 95% de confiança ($p < 0,05$); dois asteriscos (**) indicam que as diferenças são significantes estatisticamente com 99% de confiança ($p < 0,01$); e ns indica que as diferença não são estatisticamente significantes ($p > 0,05$). NR: não regulado por metionina (0 μ M).

Finalmente, para verificar se o fenótipo da redução de crescimento no ensaio de levedura estava diretamente relacionado à redução no produto final (hipusina) da reação catalisada por DHS, analisou-se o nível de hipusinação das cepas

complementadas por HsDHS, PvDHS e da cepa selvagem (SFS04, SFS05 e SFS02, respectivamente, Tabela 2) após 12 horas de tratamento com os compostos. Os seguintes *hits* encontrados no rastreamento em levedura: GNF-Pf-3738 (50 μ M), GNF-Pf-744 (100 μ M) e MMV676584 (100 μ M) foram testados quanto a sua capacidade de inibir a hipusinação em eIF5A. Os compostos GNF-Pf-744 (100 μ M) e MMV676584 (100 μ M) reduziram em 60% ($p < 0,05$) e 70% ($p < 0,01$), respectivamente, os níveis de hipusinação apenas na linhagem nocaute complementada por PvDHS (Figura 33A e B), nas demais linhagens testadas não houve redução da hipusinação mediante 12 horas de tratamento com esses compostos. Para o composto GNF-Pf-3738, a redução nos níveis de hipusinação por PvDHS não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$, Figura 33).

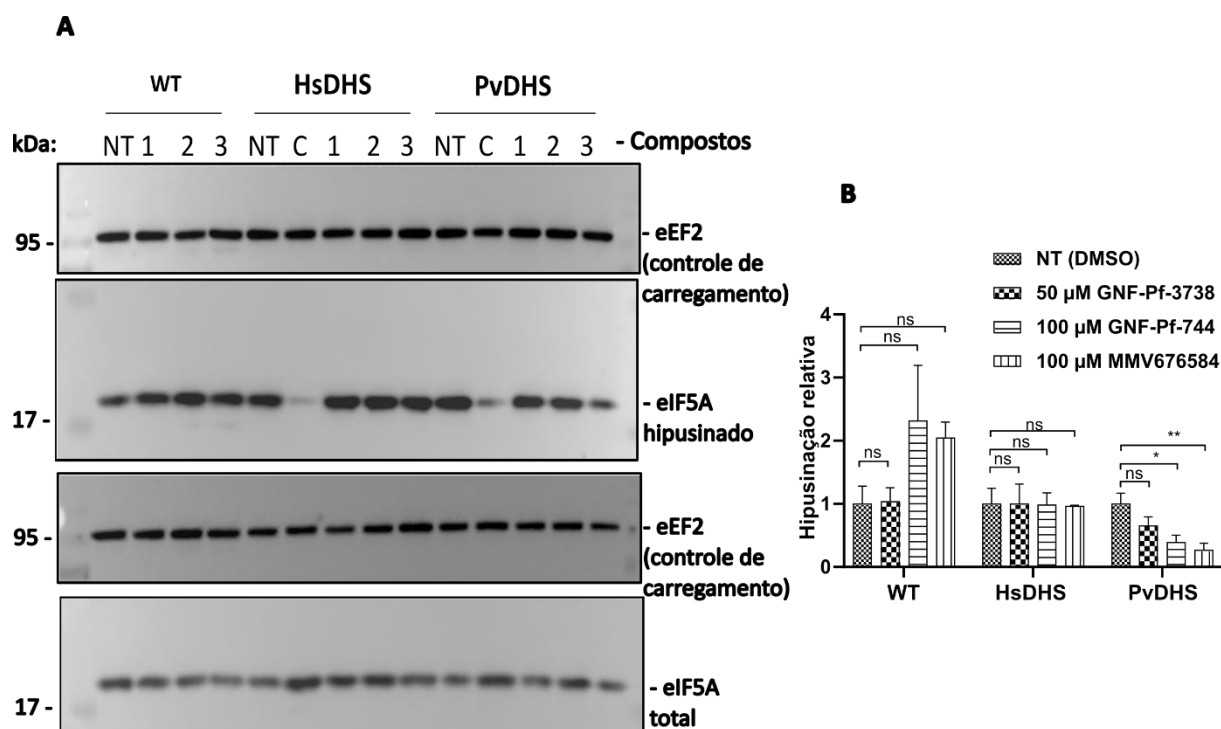


Figura 33. Hipusinação de eIF5A na presença de inibidores da PvDHS. (A) Detecção por *western blot* dos níveis de hipusinação após 12 horas de tratamento com os seguintes compostos (indicados como C, 1, 2 e 3 nas figuras e descritos adiante): C: GC7 (50 μ M); 1: GNF-Pf-3738 (50 μ M); 2: GNF-Pf-744 (100 μ M) e 3: MMV676584 (100 μ M) nas cepas selvagem (WT) e complementadas por PvDHS e HsDHS. As concentrações de metionina utilizadas nas pré-culturas foram de 130 μ M para HsDHS e 0 μ M para PvDHS e WT. (B) Gráfico reportando a razão entre eIF5A hipusinado e eIF5A total nas condições indicadas na figura. As barras representam a média dos valores de hipusinação relativa ((eIF5A hipusinado/ eEF2) / eIF5A total/ eEF2) $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Foi realizado um teste t-Student comparando a condição com composto e a condição controle de solvente em que um asterisco (*) indica que as diferenças são significantes estatisticamente com 95% de confiança ($p < 0,05$); dois asteriscos (**) indicam que as diferenças são significantes

estatisticamente com 99% de confiança ($p < 0,01$); e ns indica que as diferenças não são estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

4.6. Avaliação da citotoxicidade dos candidatos nas linhagens celulares de humano MCF7 e HepG2

Com o intuito de avaliar a toxicidade geral em células de humanos dos compostos que inibiram as DHS dos patógenos seletivamente no ensaio em *S. cerevisiae*, GNF-Pf-744, ChEMBL1081521 e GNF-Pf-3738 (Tabela 4), foi realizado um ensaio de viabilidade metabólica utilizando o reagente de viabilidade celular *Presto Blue*TM (ThermoFisher Scientific). *Presto Blue* é um reagente baseado na reação de oxidoredução da resazurina. A resazurina é um composto não tóxico, permeável às células, de cor azul e praticamente não fluorescente. Dentro das células, a resazurina é reduzida a resorufina, que produz uma cor vermelha altamente fluorescente. As células viáveis convertem continuamente a resazurina em resorufina, gerando assim uma medida quantitativa de viabilidade e citotoxicidade. Essa mudança de coloração é gradual de acordo com o número de células metabolicamente ativas (HELM et al., 2017). Os compostos foram testados nas células de câncer de mama, MCF7 e de hepatocarcinoma, HepG2.

Os compostos GNF-Pf-744 e ChEMBL1081521, seletivos para PvDHS e LmDHS, respectivamente, não inibiram a viabilidade celular nas concentrações testadas (Figuras 34). Este resultado é importante para o prosseguimento desse composto como candidato a droga.

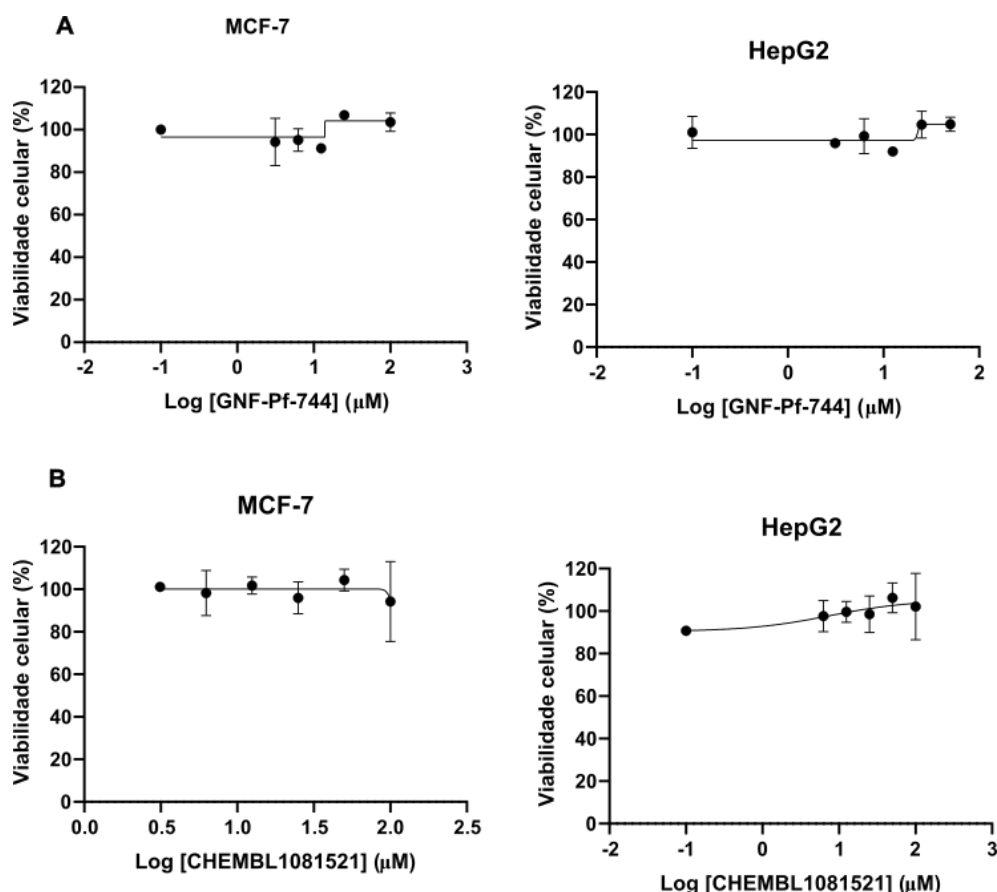


Figura 34. Determinação de IC_{50} dos compostos GNF-Pf-744 (A) e CHEMBL1081521 (B). Os compostos foram testados nas concentrações de 0,1 a 100 μM , durante 24 horas nas células MCF7 e HepG2 (indicadas nas figuras). A viabilidade celular (%) foi calculada como o quociente da razão entre célula incubada com composto e célula incubada com DMSO. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão para $n = 2$ replicatas.

Já o composto GNF-Pf-3738, que inibiu ambas as DHS de *P. vivax* e *L. major* foi tóxico nas linhagens celulares testadas, apresentando um IC_{50} predito de 32,29 μM para MCF7 (Figura 35A). O resultado aqui apresentado para esse teste do composto é preliminar e mais concentrações necessitariam ser testadas para chegar a um IC_{50} mais preciso. Por outro lado, em estudos anteriores, esse composto inibiu 50% do crescimento (CC_{50}) das células de hepatocarcinoma Huh7 a uma concentração de 14,34 μM (Tabela disponibilizada pela Novartis-GNF Malaria Box, disponível no banco de dados ChEMBL-NTDs). Por fim, o composto TCMDC-124630 foi citotóxico, inibindo 50% da viabilidade celular a uma concentração aproximada de 15 μM (Figura 35B) em ambas os tipos celulares. O resultado para TCMDC-124630 está de acordo com os resultados observados para *S. cerevisiae*, pois inibiu o crescimento de todas as linhagens, inclusive a linhagem contendo o alelo selvagem para *DYS1* (SFS01 –

Tabela 2). Esse ensaio será realizado, em breve, com o composto obtido pelo rastreamento da coleção *Pathogen box*, MMV676584.

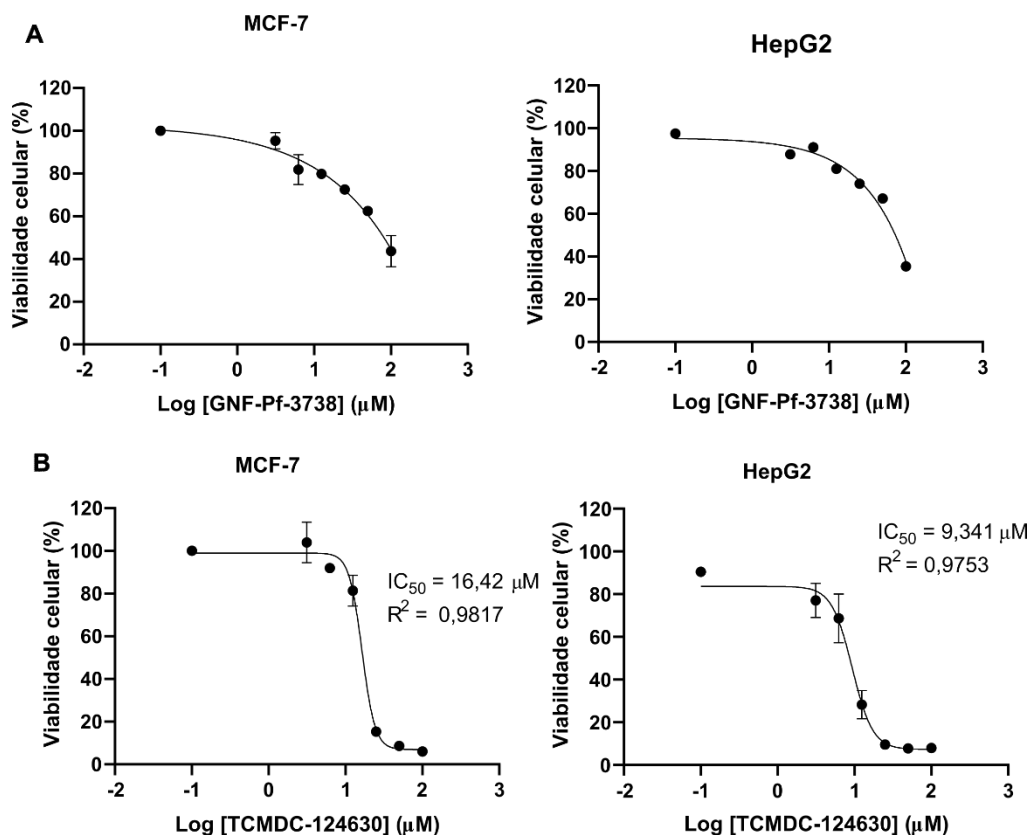


Figura 35. Determinação de IC₅₀ dos compostos GNF-Pf-3738 (A) e TCMDC-124630 (B).

Os compostos foram testados nas concentrações de 0,1 a 100 μM, durante 24 horas nas células MCF7 e HepG2 (indicadas nas figuras). A viabilidade celular (%) foi calculada como o quociente da razão entre célula incubada com composto e célula incubada com DMSO. Cada ponto representa a média ± desvio padrão para n = 2 replicatas.

4.7. Padronização do ensaio enzimático *in vitro* para LmDHS e PvDHS

Um ensaio *in vitro* robusto e sensível é um componente crítico de uma plataforma de descoberta de fármacos baseados em alvos. Idealmente, os ensaios bioquímicos para rastreamento de inibidores devem ser de baixo custo e passíveis de automação, o que permite a realização de rastreamentos utilizando várias bibliotecas de compostos. O ensaio bioquímico aqui padronizado para as enzimas DHS de *L.major* e *P. vivax* baseia-se na capacidade da DHS de catalisar uma reação parcial na presença de NAD⁺ e espermidina, resultando na formação do intermediário enzima-butilimina e NADH ligado a enzima, na ausência do precursor de eIF5A (WOLFF; WOLFF; PARK, 2000). Assim, a fluorescência do NADH (emissão em aproximadamente 440 nm) gerado pela reação parcial da DHS pode ser medida

(Figura 36). Este ensaio apresenta vantagens perante os demais ensaios de DHS já descritos em literatura (JAKUS et al., 1993), como o acoplamento direto do sinal de fluorescência à reação parcial da DHS, a facilidade de miniaturização para se ajustar ao formato *high-throughput screen* (HTS) e os custos reduzidos. Por outro lado, o uso desse ensaio em rastreamentos de HTS exige a utilização de controles, assim como ocorre em outros ensaios enzimáticos de DHS (PARK et al., 2017), para descartar artefatos relacionados à compostos fluorescentes. As proteínas purificadas utilizadas nesses ensaios foram geradas no projeto, em andamento, de outra aluna de doutorado do grupo, Angélica Hollunder Klippel. Além disso, toda a parte de padronização do ensaio enzimático da DHS de *L. major* foi realizado juntamente com a aluna Angélica Hollunder Klippel e usado na tese da mesma com diferentes finalidades.

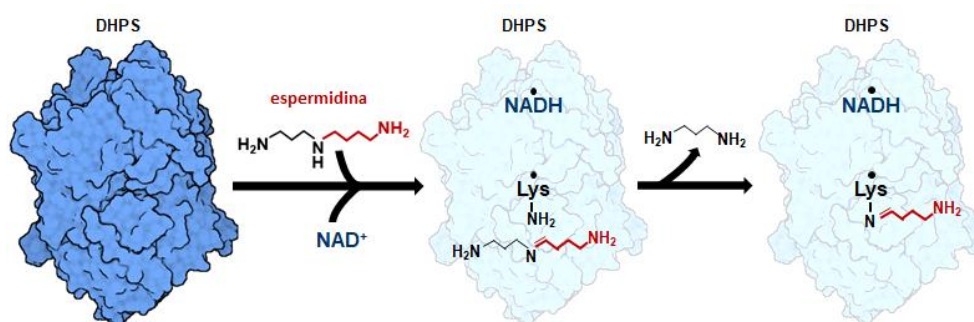


Figura 36. Reação parcial catalisada pela DHS. Mecanismo de reação *single turnover* proposto para a DHS na presença de NAD⁺ e espermidina. (SILVA et al., 2020).

Primeiramente, foi determinado o pH ótimo para a atividade das enzimas DHS de *P. vivax* e *L. major* (Figura 37A e B, respectivamente). O pH ideal para a reação das enzimas DHS já estudadas é de aproximadamente 8,8 (PARK et al., 2017; WOLFF; WOLFF; PARK, 2000). A enzima DHS de *P. vivax* apresentou um comportamento diferente das demais DHS estudadas e não apresentou uma curva de progresso similar às demais DHSs, como o observado para LmDHS (Figura 37B) com fase linear e platô bem delimitados, e a reação não atingiu um platô nesse intervalo de pH (Figura 37A), mesmo quando a reação foi realizada a um tempo superior a 2 horas (dados não mostrados). Além disso, a reação enzimática estava ocorrendo mesmo sem a adição de substrato (dados não mostrados). O pH de 7,1 foi o único em que a curva de reação enzimática da DHS de *P. vivax* atingiu um estado platô (Figura

37A) e a reação só iniciou após a adição de substrato, e foi selecionado. Para a DHS de *L. major* o pH de 8,8 (Figura 37B) foi selecionado para a realização do ensaio.

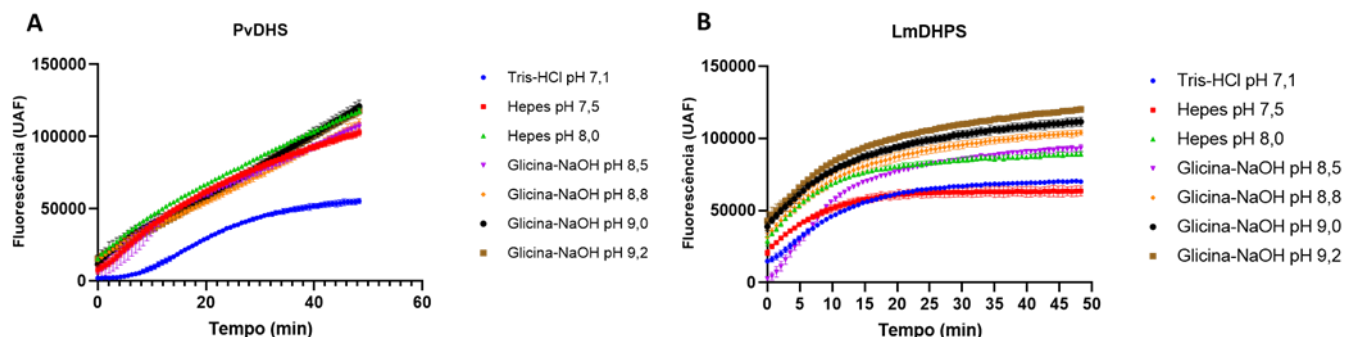


Figura 37. Determinação do pH ideal para a reação cinética das enzimas DHS de *P. vivax* (A) e *L. major* (B). O mix reacional continha: 0,1 M de tampão (indicados na figura); 1 mM de NAD⁺; 1 mM de espermidina; 5% de glicerol; 1 mM de DTT; 0,025% de Tween e 1 μ M de DHS (tetrâmero) em um volume final de 15 μ L. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.

A fluorescência produzida pelo NADH foi medida em concentrações crescentes da DHS recombinante purificada na presença de excesso de cofator NAD⁺ e do substrato espermidina (concentrações descritas em Material e Métodos na Tabela 5 e nas legendas das Figuras 38 - 40). As curvas de progresso da reação permitiram determinar uma concentração de enzima que produziu uma razão entre o sinal/ruído robusta na faixa linear da reação (dados não mostrados).

Para definir uma concentração saturante de NAD⁺ apropriada para o ensaio, as curvas de progresso da reação na presença de concentrações crescentes desse cofator (Tabela 5 – Material e Métodos) e uma concentração fixa e excessiva do substrato espermidina (Tabela 5 – Material e Métodos) foram utilizadas. Essas curvas foram utilizadas para calcular a taxa linear de formação de NADH em várias concentrações de NAD⁺. Experimentos equivalentes foram realizados para estabelecer as concentrações saturantes apropriadas do substrato espermidina para as DHSs. Nesses experimentos, a concentração do NAD⁺ foi mantida fixa (valores mencionados em Tabela 5) e a taxa linear de formação de NADH foi calculada na presença de concentrações crescentes da espermidina (Tabela 5 – Material e Métodos).

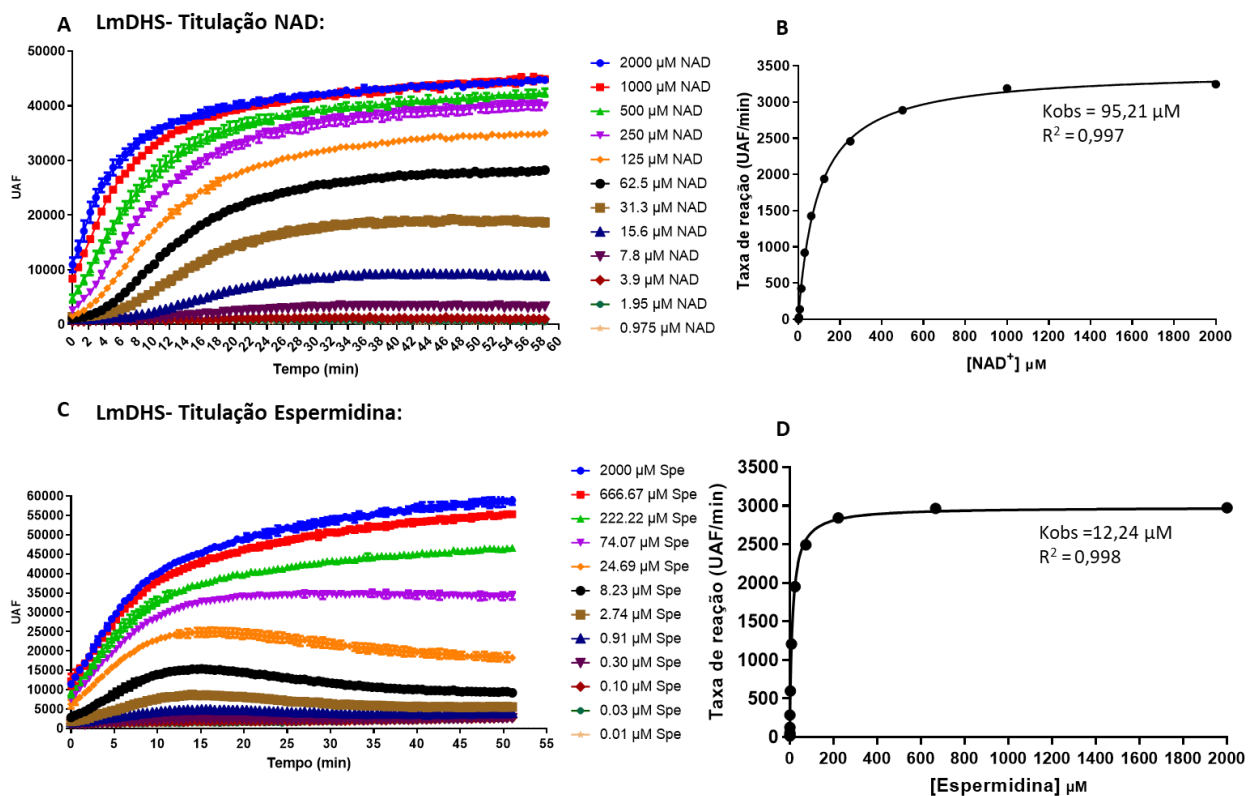


Figura 38. Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial de LmDHS e determinação dos parâmetros cinéticos. (A) Titulação do NAD^+ . Titulação do NAD^+ . Concentrações variáveis de NAD^+ (0,098 a 2000 µM) e concentrações fixas de LmDHS (0,5 µM) e espermidina (100 µM) foram usadas para realizar o experimento. (B) O valor estimado para o K_{obs} do NAD^+ é mostrado na figura. (C) Titulação da espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (0,01 a 2000 µM) e concentrações fixas de LmDHS (0,5 µM do tetrâmero) e NAD^+ (300 µM) foram utilizadas para realizar o experimento. (D) O valor estimado para o K_{obs} da espermidina é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.

Mediante a realização dessas padronizações, a relação hiperbólica da reação parcial das DHSs com a concentração de cofator foi estabelecida e utilizada para determinação dos valores de constantes cinéticas das enzimas estudadas. As constantes cinéticas observadas para LmDHS foram de $95,21 \pm 4,322 \mu M$ para NAD^+ ($K_{obs} NAD^+$, Figura 38A) e K_{obs} da espermidina de $12,24 \pm 0,485 \mu M$ (Figura 38B). A partir desses dados, a concentração fixa de aproximadamente 1,5 vezes o valor do K_{obs} para NAD^+ e 3 vezes o valor do K_{obs} para espermidina foi selecionada para a realização dos ensaios de inibição de LmDHS pelo GC7. De acordo com a curva concentração-resposta obtida, GC7 foi capaz de inibir 50% da atividade de LmDHS (IC_{50}) a uma concentração de 0,416 µM (95% intervalo de confiança = 0,3200 a 0,5408 µM) (Figura 39).

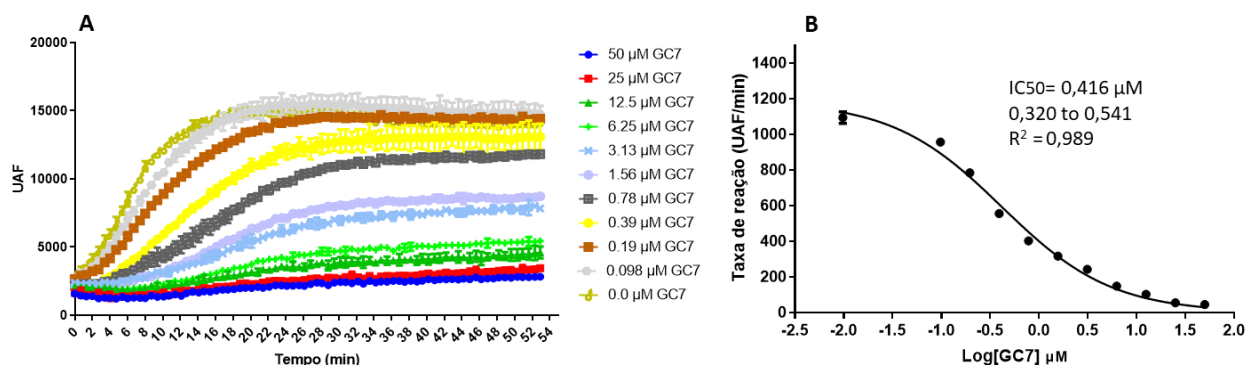


Figura 39. Determinação do IC_{50} para o GC7 em LmDHS. (A) Titulação de GC7: Foram utilizadas concentrações variáveis de GC7 (0,0098 a 50 μ M) e concentrações fixas de LmDHS (0,5 μ M do tetrâmero), espermidina (50 μ M) e NAD^+ (142,5 μ M) para a realização do experimento. (B) Determinação do IC_{50} para o GC7. O valor estimado para o IC_{50} é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.

A enzima PvDHS obteve valores de K_{obs} para NAD^+ de $502,7 \pm 37,98 \mu$ M (Figura 40A e B) e K_{obs} da espermidina de $1497 \pm 58,89 \mu$ M (Figura 40B). A partir desses dados, a concentração fixa de 1,5 vezes os valores dos K_{obs} para NAD^+ e espermidina foram selecionados para a realização dos ensaios de inibição de PvDHS pelo GC7. De acordo com a curva concentração-resposta obtida, GC7 foi capaz de inibir 50% da atividade de PvDHS (IC_{50}) a uma concentração de $69,42 \mu$ M (95% intervalo de confiança = 57,23 a 83,88 μ M) (Figura 40C), enquanto que para HsDHS nesse pH, o IC_{50} para GC7 foi de 1,2 μ M (95% intervalo de confiança = 1,094 to 1,320) (Figura 40 D e E).

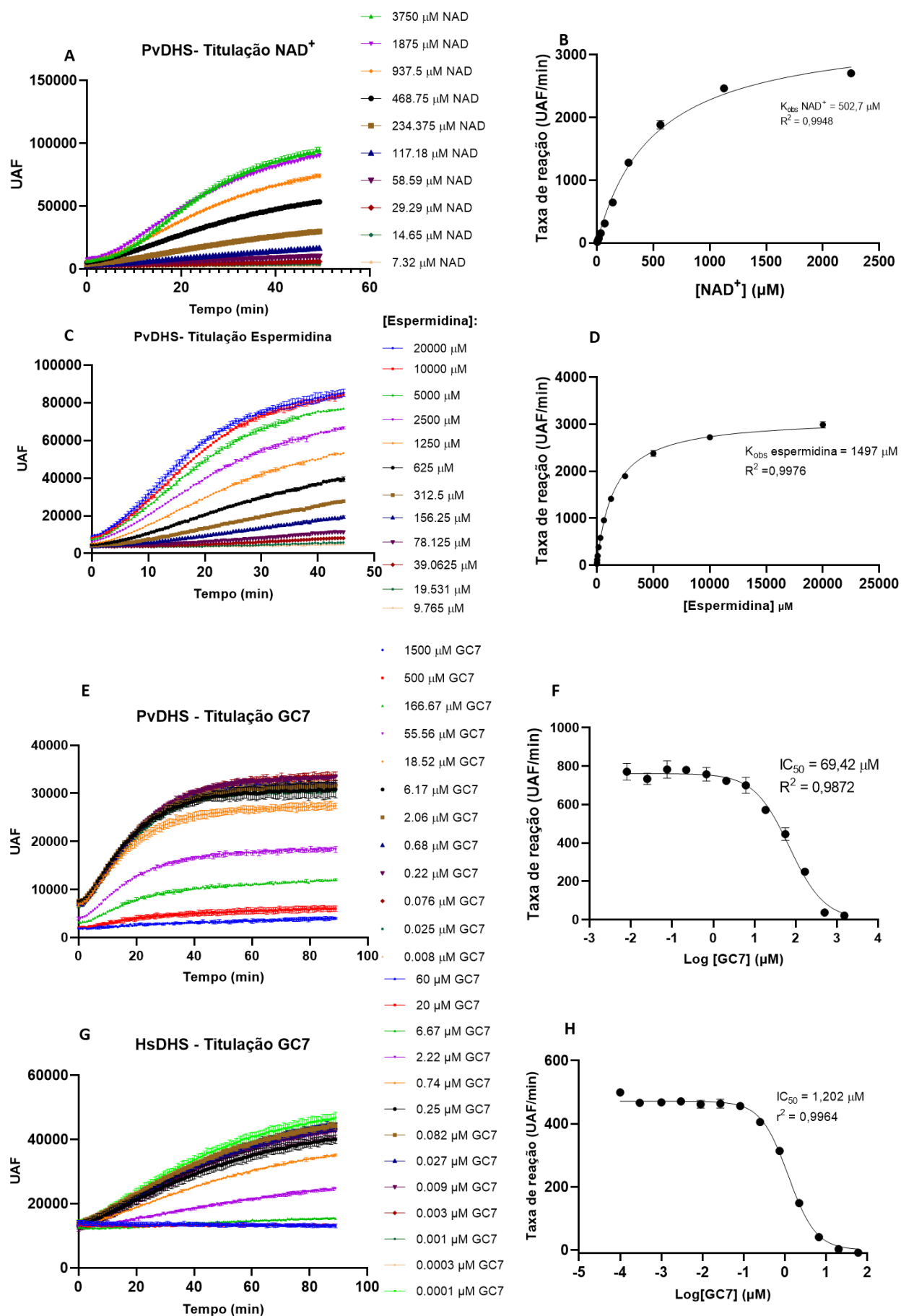


Figura 40. Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da PvDHS e determinação do IC₅₀ para o GC7. (A) Titulação do NAD⁺. Concentrações variáveis de NAD⁺ (4,39 a 2250 µM) e concentrações fixas de PvDHS (1 µM) e espermidina (5000 µM) foram usadas para realizar o experimento. (B) O valor estimado para o K_{obs} do NAD⁺ é mostrado na figura. (C) Titulação da espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (9,76 a 20000 µM) e concentrações fixas de PvDHS (1 µM do tetrâmero) e NAD⁺ (2250 µM) foram utilizadas para realizar o experimento. (D) O valor estimado para o K_{obs} da espermidina é mostrado na figura. (E) Titulação do GC7. Foram utilizadas concentrações variáveis de GC7 (0,008 a 1500 µM) e concentrações fixas de PvDHS (0,5 µM do tetrâmero), espermidina (2245,5 µM) e NAD⁺ (755 µM) para a realização do experimento. (F) O valor estimado para o IC₅₀ é mostrado na figura. (G) Titulação do GC7 na enzima HsDHS. Foram utilizadas concentrações variáveis de GC7 (0,0001 a 60 µM) e concentrações fixas de PvDHS (0,5 µM do tetrâmero), espermidina (16,5 µM) e NAD⁺ (36 µM) para a realização do experimento. (H) O valor estimado para o IC₅₀ é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média ± erro padrão de duplicatas experimentais.

Os valores das constantes cinéticas e IC₅₀ de LmDHS obtidos para o GC7 nesse estudo estão em concordância com os valores descritos para DHSs de tripanosomatídeos, tanto nos ensaios monitorando a reação parcial quanto na reação completa, ou seja na presença de excesso de cofator NAD⁺ e de ambos os substratos necessários para a reação completa da DHS - espermidina e eIF5A (valores de IC₅₀ aproximadamente 1 µM) (NGUYEN et al., 2013b). O fato dos valores de IC₅₀ serem semelhantes para as reações parciais e completas era esperado, uma vez que o GC7 compete com a espermidina, o substrato da primeira etapa da reação catalisada pela DHS.

Infelizmente para PvDHS, apesar de o ensaio mostrar curvas concentração-resposta, os valores tanto para as constantes cinéticas quanto para o IC₅₀ foram pelo menos 50 vezes superiores aos previamente descritos para DHS de mamíferos e tripanossomatídeos (LIU et al., 2021; NGUYEN et al., 2013b; WOLFF; WOLFF; PARK, 2000), nessa condição reacional. Já havia sido descrito que para *P. falciparum* a constante de inibição obtida para o GC7 é 50% maior que a constante obtida para a enzima de humano (KAISER et al., 2007). Ainda assim, o valor obtido na padronização deste ensaio foi muito superior e, por esse motivo, um novo teste de tampão Tris-HCl em diferentes pHs foi realizado (Figura 41), para analisar se essa mudança da condição reacional alteraria os parâmetros cinéticos de PvDHS.

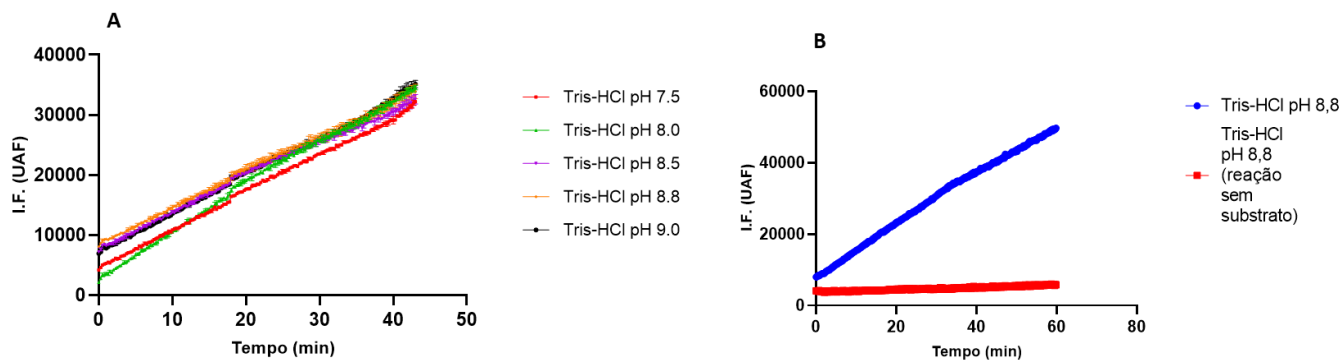


Figura 41. Determinação do tampão ideal para a reação cinética da enzima DHS de *P. vivax*. (A) Curva de progresso da reação de PvDHS em tampão Tris-HCl em diferentes pHs. O mix reacional continha: 0,1 M de tampão Tris-HCl (pH indicados na figura); 1 mM de NAD^+ ; 1 mM de espermidina; 5% de glicerol; 1 mM de DTT; 0,025% de Tween e 0,5 μM de DHS (tetrâmero) em um volume final de 15 μL (B) Curva de progresso da reação de PvDHS em tampão Tris-HCl pH 8,8 com (azul) e sem a adição do substrato espermidina (vermelho). Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.

Não houve muita variação entre as curvas de progresso utilizando o tampão Tris-HCl nos diferentes pHs testados (Figura 41A). Ao testarmos as reações sem a adição de substrato, não houve atividade enzimática, assim o pH 8,8 foi selecionado (Figura 41B), por ser um dos pHs mais utilizados para as enzimas DHS já estudadas (SILVA et al., 2020; UMLAND et al., 2004), pois nesse pH é esperado que a espermidina esteja majoritariamente na forma desprotonada favorecendo a reação, uma vez que o sítio ativo é altamente carregado (UMLAND et al., 2004).

Na nova condição reacional, foram realizadas titulações do cofator e do substrato para a determinação dos parâmetros cinéticos. A enzima PvDHS obteve novos valores de K_{obs} para NAD^+ de $902,9 \pm 17,02 \mu\text{M}$ (Figura 42A e B) e K_{obs} da espermidina de $17,74 \pm 4,87 \mu\text{M}$ (Figura 42C e D). Nesse pH, a afinidade de PvDHS pela espermidina aumentou em 84 vezes em comparação ao pH 7,1 (Figura 37). A partir dos dados das constantes cinéticas estabelecidas, a concentração de 1,5 vezes os valores dos K_{obs} para NAD^+ e espermidina foram utilizados para a realização dos ensaios de inibição de PvDHS pelo GC7. De acordo com a curva concentração-resposta obtida (Figura 42E), GC7 foi capaz de inibir 50% da atividade enzimática de PvDHS (IC_{50}) a uma concentração de 1,088 μM (95% intervalo de confiança = 0,002 a 3,69) (Figura 42F), sendo assim um valor similar ao descrito para o IC_{50} de GC7 na DHS de parasitas (NGUYEN et al., 2013b).

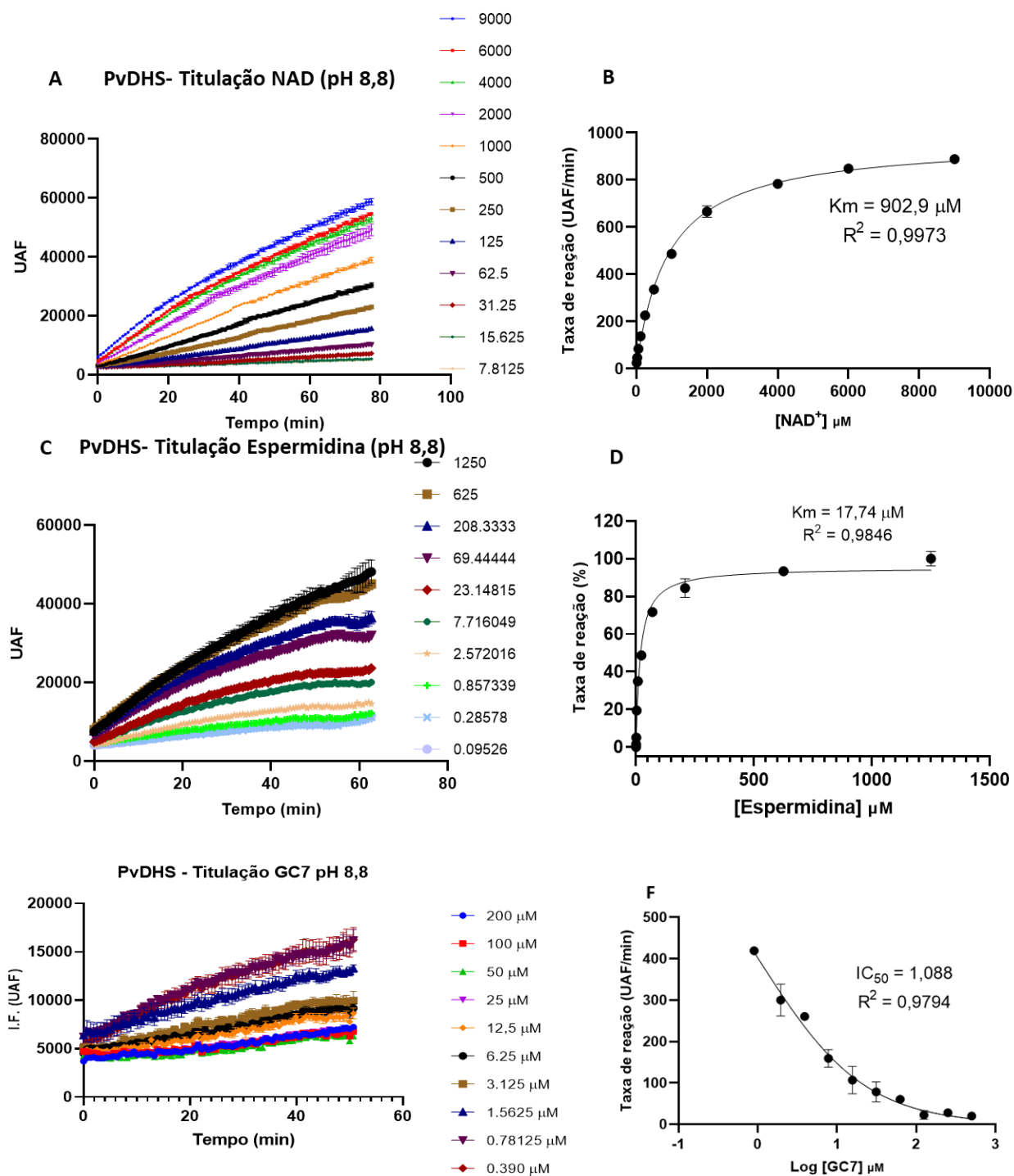


Figura 42. Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da PvDHS em pH 8,8 e determinação do IC_{50} para o GC7. (A) Titulação do NAD^+ . Concentrações variáveis de NAD^+ (7,8 a 9000 μM) e concentrações fixas de PvDHS (0,5 μM) e espermidina (1000 μM) foram usadas para realizar o experimento. (B) O valor estimado para o K_{obs} do NAD^+ é mostrado na figura. (C) Titulação da espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (0,09 a 1250 μM) e concentrações fixas de PvDHS (0,5 μM do tetrâmero) e NAD^+ (3660 μM) foram utilizadas para realizar o experimento. (D) O valor estimado para o K_{obs} da espermidina é mostrado na figura. (E e F) Determinação do IC_{50} para o GC7. Foram utilizadas concentrações variáveis de GC7 (1,9 a 1000 μM) e concentrações fixas

de PvDHS (0,5 μM do tetrâmero), espermidina (26,6 μM) e NAD^+ (1805 μM) para a realização do experimento. O valor estimado para o IC_{50} é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.

Após a padronização do ensaio enzimático, foi realizado o teste dos candidatos: ChEMBL1081521; GNF-Pf-744; GNF-Pf-3738 e MMV676584, selecionados pelo ensaio em levedura, em PvDHS e LmDHS. Infelizmente, com exceção do composto GNF-Pf-744, os demais compostos foram fluorescentes nesse comprimento de onda, apresentando valores de fluorescência maiores que o limite de detecção do equipamento, e não puderam ser testados por esse método, mesmo com a adição de controles. O composto GNF-Pf-744, que apresentou resultados promissores no ensaio em levedura, inibiu a enzima DHS de *P. vivax* *in vitro* apenas a concentrações acima de 62,5 μM e obteve baixa afinidade com a enzima, apresentando uma capacidade inibitória de 50% da atividade enzimática de PvDHS predita pelo *software* maior que 1 mM (maior que a concentração testada) (PvDHS, Figura 43), sendo muito menos potente que o esperado. Por fim, o composto não inibiu a enzima HsDHS nas concentrações testadas (HsDHS, Figura 43).

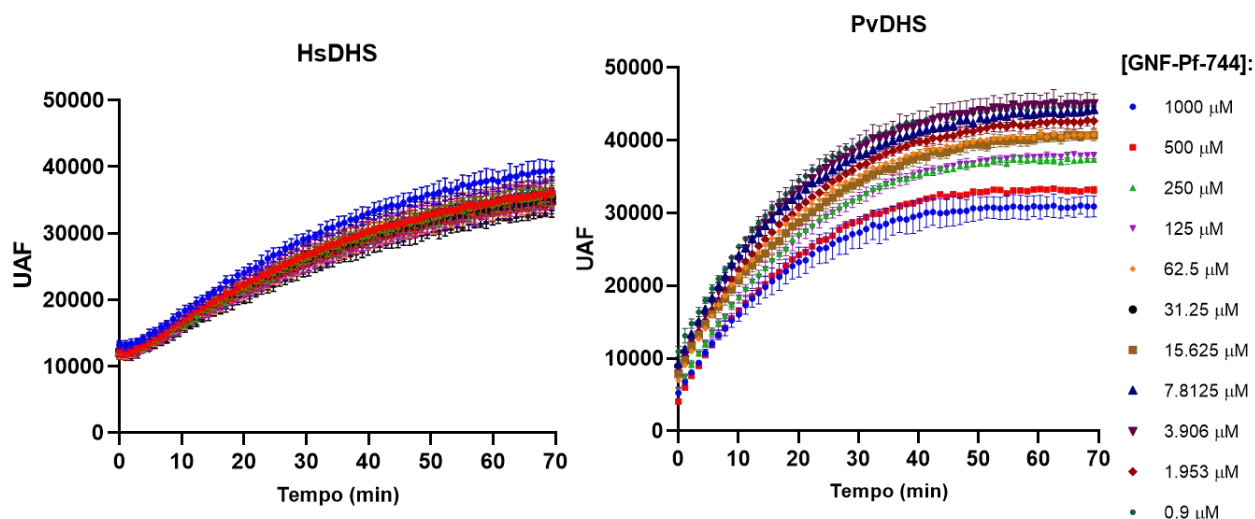


Figura 43. Teste da inibição de GNF-Pf-744 nas enzimas HsDHS e PvDHS usando o ensaio enzimático empregando a reação parcial. Foram utilizadas concentrações variáveis de GNF-Pf-744 (Tabela 2) (0,9 a 1000 μM) e concentrações fixas de PvDHS (0,5 μM do tetrâmero), espermidina (26,6 μM) e NAD^+ (1805 μM) para a realização do experimento. O valor estimado para o IC_{50} é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.

O motivo pelo qual tal discrepância entre o ensaio *in vivo* e *in vitro* ocorrem é desconhecido até o momento. Para investigar uma possível degradação do composto foi realizado uma análise por LC-MS, mas o composto apresentou a massa molecular esperada (dados não mostrados). Duas hipóteses relacionadas ao ensaio bioquímico e ao composto em si podem ser consideradas: 1) devido ao ensaio *in vitro* ser capaz de identificar inibidores da reação parcial da DHS (Figura 1B); 2) GNF-Pf-744 pode ser uma pró-droga, necessitando de biotransformação para sua ativação (OBACH, 2013).

Na tentativa de testar os compostos fluorescentes, iniciamos a padronização de um ensaio baseado em luminescência, onde a reação parcial é acoplada a reação de NADH-Glo (PARK et al., 2017). No entanto, o kit adquirido foi incompatível com testes de inibição usando as enzimas PvDHS e LmDHS, por razões desconhecidas. Ao testar o clássico inibidor da DHS, GC7 (JAKUS et al., 1993), nas enzimas PvDHS e LmDHS por esse método, nenhuma inibição da atividade enzimática foi observada (dados não mostrados), o que está totalmente em discordância com os resultados obtidos pelo ensaio bioquímico por fluorescência (Figuras 39 e 42). Um outro lote desse kit já havia sido utilizado anteriormente pela aluna Angélica H. Klippel (Tese Angélica H. Klippel, dados não publicados) e o mesmo comportamento não foi observado.

Além disso, a proteína eIF5A de *S. cerevisiae* foi purificada para estabelecer um ensaio enzimático englobando a reação enzimática completa de DHS. Esse experimento está em andamento e poderá ser adicionado aos resultados finais do manuscrito, uma vez que poderá ser relevante a obtenção dos dados da inibição da DHS pelos *hits*, através de ensaios bioquímicos *in vitro*. Por fim, outra alternativa para a validação da DHS como alvo dos compostos é a realização de ensaios no sistema levedura, superexpressando DHS em um plasmídeo de alto número de cópias e observando os efeitos fenotípicos do tratamento com os compostos nessas condições. A obtenção desses dados confirmariam os já obtidos da inibição da DHS no sistema de substituição em levedura, da redução do crescimento das linhagens complementadas por PvDHS e da redução nos níveis de hipusina, que é o produto final formado na reação catalisada por DHS, pelos compostos GNF-Pf-744 e MMV676584; e da redução do crescimento de LmDHS pelo composto ChEMBL1081521.

5. CONCLUSÃO

Foram geradas construções dos genes DHS de *B. Malayi* (BmDHS), *L. major* (LmDHS), *P. vivax* (PvDHS) e *H. sapiens* (HsDHS) utilizando o vetor de expressão em levedura pCM188 (Tabela 1) e construções das DHSs de *L. major*, *P. vivax* e *H.sapiens* também em uma versão do vetor pCM188 modificada para conter o promotor de *MET3*, pCM188-MET3 (Tabela 1). Usando essas construções, desenvolveu-se duas versões de sistemas de linhagens nocautes para o gene DHS de *S. cerevisiae* (*dys1*) substituídas pelos genes DHS dos organismos patogênicos e de humano (Tabela 2). Na primeira versão, o nocaute de *dys1* foi complementado pelo genes DHS ortólogos que estavam nos plasmídeos pCM188, gerando assim as linhagens complementadas por BmDHS (VZL1400, Tabela 2), LmDHS (VZL1474, Tabela 2), PvDHS (VZL1472, Tabela 2) e HsDHS (VZL1464, Tabela 2). Através de ensaios usando essa plataforma de substituição, as proteínas DHS de *L. major* só foram capazes de complementar funcionalmente *dys1* quando expressas concomitantemente, sugerindo que a enzima LmDHS é funcional como heterocomplexo, assim como a proteína DHS de *T. Brucei*, confirmando uma arquitetura incomum para essa proteína em relação à proteína de *H. Sapiens* (SILVA et al., 2020).

Na segunda versão da plataforma de *S. cerevisiae* gerada, modificações genéticas utilizando o sistema CRISPR-Cas9 foram realizadas. Primeiramente partiu-se de uma linhagem com deleção dos genes *PDR1*, *PDR3* e *SNQ2*, que afetam a resposta pleiotrópica a moléculas pequenas, deixando as linhagens mais sensíveis para a entrada de compostos. Nessa linhagem foram integradas diferentes proteínas fluorescentes: *Sapphire* (SFS02, Tabela 2), *mCherry* (SFS01, Tabela 2) e *Venus* (SFS03, Tabela 2), e a partir dessas novas linhagens o gene *DYS1* foi deletado e substituído pelos genes de HsDHS, PvDHS e LmDHS, gerando as linhagens SFS04, SFS05 e SFS06, respectivamente (Tabela 2). As duas versões de linhagens geradas foram capazes de realizar a modificação pós traducional de eIF5A de levedura, hipusinação, e foram usadas para o rastreamento de pequenas moléculas que sejam ativas contra DHS de *L. major* e *P. vivax*. Além disso, em testes de curva de crescimento utilizando o inibidor da DHS de humano, GC7, as linhagens se mostraram capazes de identificar inibidores da DHS, uma vez que o crescimento das linhagens foi reduzido.

Para a busca de inibidores com enfoque nas enzimas DHS de *L. major* e *P. vivax*, seguiu-se três abordagens principais: 1) Triagem virtual das coleções de compostos do banco de dados ChEMBL-NTDs; 2) Verificação do crescimento diferencial das linhagens mutantes geradas, na presença dos compostos selecionados por triagem virtual e 3) Rastreamento da coleção *Pathogen box* em ensaios de curva de crescimento na linhagem mutante complementada por PvDHS.

Através do rastreamento *in silico*, foram selecionados nove compostos dentre as coleções do banco de dados ChEMBL-NTDs: GNF-Pf-3680, ChEMBL1081521, GNF-Pf-744, ChEMBL3493253, TCMD-124630, ZINC518875, GNF-Pf-4241, GNF-Pf-3738, ChEMBL1305755 (Tabela 7), que apresentaram um maior número de interações fortes para as enzimas dos parasitas em relação a enzima de humano. Esses compostos foram testados, em ensaios de curva de crescimento na plataforma de *S. cerevisiae* e três candidatos mostraram uma redução de crescimento maior para uma das linhagens complementadas por PvDHS ou LmDHS (SFS05 e VZL1474, Tabela 2) em comparação com as linhagens selvagem (SFS01, Tabela 2) e HsDHS (SFS04, Tabela 2). Dentre esses, a molécula GNF-Pf-744 apresentou dose-resposta para a inibição de PvDHS, reduzindo 95% do crescimento a 200 μ M, 65% a 100 μ M, 30% a 50 μ M e 13% usando 25 μ M do composto (Figura 23A). A redução do crescimento de HsDHS por essa molécula não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 23A) e, por fim, GNF-Pf-744 reduziu apenas 17% do crescimento da linhagem selvagem usando 200 μ M do composto (Figura 23A). GNF-Pf-3738 inibiu ambos PvDHS e LmDHS (Figuras 19 e 20, respectivamente) e, por fim, o composto ChEMBL1081521 reduziu o crescimento da cepa substituída pela DHS de *L. major* (Figuras 20 e 24). Em teste de citotoxicidade em células de humano, apenas o composto GNF-Pf-3738 foi citotóxico (Figura 35).

O rastreamento da coleção *Pathogen box* ainda necessita de ajustes, mas dos resultados obtidos até o momento, encontramos 3 inibidores específicos para PvDHS: MMV676409, MMV676584 e MMV688991, entre os quais MMV676584 foi confirmado para a inibição do crescimento de PvDHS em *S. cerevisiae*, por ensaios de dose-resposta *in vivo*, utilizando novo lote do reagente (Figura 29).

Um ensaio bioquímico *in vitro* por fluorescência foi padronizado para LmDHS (Figuras 38 e 39) e PvDHS (Figuras 40 a 42), com o intuito de realizar a confirmação da inibição da enzima DHS *in vitro*, no entanto a maioria dos compostos foram

fluorescentes e não puderam ser testados por esse ensaio. O composto GNF-Pf-744 foi testado através desse ensaio e inibiu a enzima DHS de *P. vivax* apenas a concentrações acima de 62,5 μ M e obteve baixa afinidade com a enzima (Figura 43).

Assim, um ensaio de detecção da hipusinação por *western blot* foi padronizado para confirmação dos *hits*, no qual se nota que os compostos GNF-Pf-744 e MMV676584 reduziram significativamente a taxa de eIF5A hipusinado em PvDHS (Figura 33). Reportamos aqui novos compostos com potencial inibitório para DHS de *P. vivax* e *L. major*, que poderão ser pontos de partida para o desenvolvimento de novos inibidores específicos para a proteína DHS de *P. vivax* e/ ou *L. major*. No entanto, para confirmar os dados aqui obtidos da inibição da DHS no sistema de substituição em levedura, através da redução do crescimento das linhagens complementadas e da redução nos níveis de hipusina, ainda temos como perspectiva futura, a realização dos seguintes experimentos: teste de citotoxicidade do composto MMV676584 em cultura de células de humano; e a padronização de um ensaio enzimático *in vitro* englobando a reação enzimática completa de DHS para teste dos *hits*.

REFERÊNCIAS

- AFANADOR, G. A.; TOMCHICK, D. R.; PHILLIPS, M. A. Trypanosomatid Deoxyhypusine Synthase Activity Is Dependent on Shared Active-Site Complementation between Pseudoenzyme Paralogs. **Structure**, v. 26, n. 11, p. 1499- 1512.e5, 6 nov. 2018.
- AKHMETOV, A. et al. Single-step Precision Genome Editing in Yeast Using CRISPR-Cas9. **Bio-protocol**, v. 8, n. 6, p. e2765, 20 mar. 2018.
- ALALAM, H. et al. A Genetic Trap in Yeast for Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease. **mSystems**, v. 6, n. 6, p. e01087-21, 23 nov. 2021.
- ALTAMURA, F. et al. The current drug discovery landscape for trypanosomiasis and leishmaniasis: Challenges and strategies to identify drug targets. **Drug Development Research**, v. 83, n. 2, p. 225–252, 2022.
- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D.-A. et al. Overcoming the global burden of neglected tropical diseases. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 7, 1 jan. 2020.
- AROONSRI, A. et al. Validation of Plasmodium falciparum deoxyhypusine synthase as an antimalarial target. **PeerJ**, v. 7, n. e6713, 2019.
- AROONSRI, A. et al. Investigation of an Allosteric Deoxyhypusine Synthase Inhibitor in P. falciparum. **Molecules**, v. 27, n. 8, p. 2463, jan. 2022.
- BARBOSA, C. S. et al. Synthesis, Structure–Activity Relationships, and Parasitological Profiling of Brussonol Derivatives as New Plasmodium falciparum Inhibitors. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 7, p. 814, jul. 2022.
- BARROS, L. B. et al. Clinically silent *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians of northwestern Brazil: acquired immunity or low parasite virulence? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, 16 dez. 2022.
- BILSLAND, E. et al. Functional Expression of Parasite Drug Targets and Their Human Orthologs in Yeast. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, p. e1320, 4 out. 2011.
- BILSLAND, E. et al. Yeast-based automated high-throughput screens to identify anti-parasitic lead compounds. **Open Biology**, v. 3, n. 2, p. 120158, fev. 2013.
- BILSLAND, E. et al. Yeast-Based High-Throughput Screens to Identify Novel Compounds Active against Brugia malayi. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004401, 26 jan. 2016.
- BILSLAND, E. et al. Plasmodium dihydrofolate reductase is a second enzyme target for the antimalarial action of triclosan. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1038, 1 dez. 2018.
- BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T. **Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual**. 2000 ed ed. Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

CHAWLA, B. et al. Identification and characterization of a novel deoxyhypusine synthase in *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 1, p. 453–463, 1 jan. 2010.

CHEN, Z. P. et al. Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. **Cancer Letters**, v. 105, n. 2, p. 233–239, 2 ago. 1996.

CHENG, A. C. et al. Structure-based maximal affinity model predicts small-molecule druggability. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 71–75, jan. 2007.

CHU, J. H. AND A. M. Yeast Colony PCR. 31 jan. 2017.

CONI, S. et al. Blockade of EIF5A hypusination limits colorectal cancer growth by inhibiting MYC elongation. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 12, p. 1–14, 10 dez. 2020.

CUPERUS, J. T. et al. A tetO Toolkit To Alter Expression of Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Synthetic Biology**, v. 4, n. 7, p. 842–852, 17 jul. 2015.

DA SILVA, N. A.; SRIKRISHNAN, S. Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 2, p. 197–214, mar. 2012.

D'AGOSTINO, M. et al. Insights Into the Binding Mechanism of GC7 to Deoxyhypusine Synthase in *Sulfolobus solfataricus*: A Thermophilic Model for the Design of New Hypusination Inhibitors. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 2020.

DENNY, P. W. Yeast: bridging the gap between phenotypic and biochemical assays for high-throughput screening. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, n. 12, p. 1153–1160, 2 dez. 2018.

DENNY, P. W.; STEEL, P. G. Yeast as a Potential Vehicle for Neglected Tropical Disease Drug Discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 56–63, 1 jan. 2015.

DICARLO, J. E. et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 7, p. 4336–4343, 1 abr. 2013.

DONNELLY, M. L. L. et al. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein “cleavage” mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: A putative ribosomal “skip”. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 5, p. 1013–1025, 1 maio 2001.

DUINA, A. A.; MILLER, M. E.; KEENEY, J. B. Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. **Genetics**, v. 197, n. 1, p. 33–48, maio 2014.

ENGELS, D.; HUANG, F.; ZHOU, X. Time to Integrate Malaria and Neglected Tropical Diseases Control and Elimination. **China CDC Weekly**, v. 3, n. 17, p. 372–374, 23 abr. 2021.

ENGELS, D.; ZHOU, X.-N. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 10, 28 jan. 2020.

FAIRLAMB, A. H. et al. Drug resistance in eukaryotic microorganisms. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 7, p. 1–15, 24 jun. 2016.

FRAME, I. J. et al. Yeast-based High-Throughput Screen Identifies Plasmodium falciparum Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Inhibitors That Kill Malaria Parasites. **ACS chemical biology**, v. 10, n. 3, p. 775–783, 20 mar. 2015.

FREARSON, J. A. et al. Target assessment for antiparasitic drug discovery. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 12, p. 589–595, 1 dez. 2007.

FREDERICK M AUSUBEL. Current Protocols in Molecular Biology. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 133, n. 1, 2020.

FRIESNER, R. A. et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739–1749, 1 mar. 2004.

GARÍ, E. et al. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast (Chichester, England)**, v. 13, n. 9, p. 837–848, jul. 1997.

GIAROLLA, J.; FERREIRA, E. I. Drug Design for Neglected Disease in Brazil. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 220–242, 2015.

HASENBRINK, G. et al. Analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium influx defective *Saccharomyces cerevisiae* strains determined as changes in growth characteristics. **FEBS Letters**, v. 579, n. 7, p. 1723–1731, 2005.

HAUBER, I. et al. Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 1, p. 76–85, 3 jan. 2005.

HEALTH, T. L. G. Taking the neglected out of neglected tropical diseases. **The Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. e152, 1 fev. 2020.

HELM, K. et al. In Vitro Cell Death Discrimination and Screening Method by Simple and Cost-Effective Viability Analysis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 1011–1019, 2017.

HILGARTH, R. S.; LANIGAN, T. M. Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction. **MethodsX**, v. 7, p. 100759, 1 jan. 2020.

HOERAUF, A. et al. Filariasis in Africa—treatment challenges and prospects. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 7, p. 977–985, 2011.

HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R. The druggable genome. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 9, p. 727–730, set. 2002.

HOQUE, M. et al. Inhibition of HIV-1 gene expression by Ciclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. **Retrovirology**, v. 6, n. 1, p. 90, 13 out. 2009.

ISTVAN LAZAR. **GelAnalyzer**. Disponível em: <<http://gelanalyzer.com/?i=1>>. Acesso em: 6 fev. 2023.

IVANOV, I. P. et al. Polyamine Control of Translation Elongation Regulates Start Site Selection on Antizyme Inhibitor mRNA via Ribosome Queuing. **Molecular Cell**, v. 70, n. 2, p. 254–264.e6, 19 abr. 2018.

JAKUS, J. et al. Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 18, p. 13151–13159, jun. 1993.

JASIULIONIS, M. G. et al. Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) hypusination impairs melanoma growth. **Cell Biochemistry and Function**, v. 25, n. 1, p. 109–114, 2007.

JEELANI, G.; NOZAKI, T. Eukaryotic translation initiation factor 5A and its posttranslational modifications play an important role in proliferation and potentially in differentiation of the human enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 2, p. e1008909, 16 fev. 2021.

KAHM, M. et al. Grofit: Fitting biological growth curves. **Nature Precedings**, p. 1–1, 1 jun. 2010.

KAISER, A. et al. Modification of eukaryotic initiation factor 5A from *Plasmodium vivax* by a truncated deoxyhypusine synthase from *Plasmodium falciparum*: An enzyme with dual enzymatic properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 18, p. 6200–6207, 15 set. 2007.

KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 6, p. 3934–3940, fev. 1994.

LANA, R. et al. The top 1%: quantifying the unequal distribution of malaria in Brazil. **Malaria Journal**, v. 20, n. 1, p. 87, 12 fev. 2021.

LAND, H.; HUMBLE, M. S. YASARA: A Tool to Obtain Structural Guidance in Biocatalytic Investigations. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1685, p. 43–67, 2018.

LANDAU, G. et al. The Role of Polyamines in Supporting Growth of Mammalian Cells Is Mediated through Their Requirement for Translation Initiation and Elongation♦. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12474–12481, 23 abr. 2010.

LEE, M. E. et al. A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. **ACS Synthetic Biology**, v. 4, n. 9, p. 975–986, 18 set. 2015.

LI, L. et al. EIF5A expression and its role as a potential diagnostic biomarker in hepatocellular carcinoma. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 16, p. 4774–4779, 11 jun. 2021.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, In Vitro Models for Selection of Development Candidates. v. 23, n. 1, p. 3–25, 15 jan. 1997.

LIU, J. et al. Translational Regulation of HIV-1 Replication by HIV-1 Rev Cellular Cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 308–321, 1 jun. 2011.

LIU, K. et al. Novel Allosteric Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase against Malignant Melanoma: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 18, p. 13356–13372, 23 set. 2021.

MADHAVI SASTRY, G. et al. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 27, n. 3, p. 221–234, 1 mar. 2013.

MAIER, B.; TERSEY, S. A.; MIRMIRA, R. G. Hypusine: a New Target for Therapeutic Intervention in Diabetic Inflammation. **Discovery Medicine**, v. 10, n. 50, p. 18–23, 30 jun. 2010.

MANDAL, A.; MANDAL, S.; PARK, M. H. Global quantitative proteomics reveal up-regulation of endoplasmic reticulum stress response proteins upon depletion of eIF5A in HeLa cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25795, 16 maio 2016.

MANJUNATH, H. et al. Suppression of Ribosomal Pausing by eIF5A Is Necessary to Maintain the Fidelity of Start Codon Selection. **Cell Reports**, v. 29, n. 10, p. 3134–3146.e6, 3 dez. 2019.

MAO, X. et al. MET3 Promoter: A Tightly Regulated Promoter and Its Application in Construction of Conditional Lethal Strain. **Current Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 37–40, 1 jul. 2002.

MARILLONNET, S.; GRÜTZNER, R. Synthetic DNA Assembly Using Golden Gate Cloning and the Hierarchical Modular Cloning Pipeline. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 130, n. 1, p. e115, 2020.

MARTINEZ-ROCHA, A. L. et al. Posttranslational hypusination of the eukaryotic translation initiation factor-5A regulates *Fusarium graminearum* virulence. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24698, 21 abr. 2016.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected Tropical Diseases: Epidemiology and Global Burden. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 2, n. 3, p. 36, 5 ago. 2017.

- NAKANISHI, S.; CLEVELAND, J. L. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. **Amino Acids**, v. 48, n. 10, p. 2353–2362, 1 out. 2016.
- NGUYEN, S. et al. Allosteric Activation of Trypanosomatid Deoxyhypusine Synthase by a Catalytically Dead Paralog * ♦. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 21, p. 15256–15267, 24 maio 2013.
- NISHIMURA, K. et al. Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development. **Amino Acids**, v. 42, n. 2–3, p. 703–710, fev. 2012a.
- NISHIMURA, K. et al. Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development. **Amino Acids**, v. 42, n. 2, p. 703–710, 1 fev. 2012b.
- NORCLIFFE, J. L. et al. The utility of yeast as a tool for cell-based, target-directed high-throughput screening. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 8–16, jan. 2014.
- OBACH, R. S. Pharmacologically Active Drug Metabolites: Impact on Drug Discovery and Pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 2, p. 578–640, 1 abr. 2013.
- OLIVERIO, S. et al. The spermidine analogue GC7 (N1-guanyl-1,7-diamineoheptane) induces autophagy through a mechanism not involving the hypusination of eIF5A. **Amino Acids**, v. 46, n. 12, p. 2767–2776, 1 dez. 2014.
- PADGETT, L. R. et al. Deoxyhypusine synthase, an essential enzyme for hypusine biosynthesis, is required for proper exocrine pancreas development. **The FASEB Journal**, v. 35, n. 5, p. e21473, 2021.
- PANDEY, R. et al. High throughput in silico identification and characterization of Plasmodium falciparum PRL phosphatase inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 36, n. 13, p. 3531–3540, out. 2018.
- PANDEY, R. et al. A Plasmodium falciparum protein tyrosine phosphatase inhibitor identified from the ChEMBL-NTD database blocks parasite growth. **FEBS open bio**, v. 11, n. 7, p. 1921–1929, jul. 2021.
- PARK, M. H. et al. Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 45, p. 27827–27832, nov. 1994.
- PARK, M. H. et al. A new nonradioactive deoxyhypusine synthase assay adaptable to high throughput screening. **Amino acids**, v. 49, n. 11, p. 1793–1804, nov. 2017.
- PARK, M. H.; JOE, Y. A.; KANG, K. R. Deoxyhypusine Synthase Activity Is Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 3, p. 1677–1683, 16 jan. 1998.
- PARK, M. H.; WOLFF, E. C. Hypusine, a polyamine-derived amino acid critical for eukaryotic translation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 48, p. 18710–18718, 30 nov. 2018b.

PELECHANO, V.; ALEPUZ, P. eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 12, p. 7326–7338, 7 jul. 2017.

PIOTROWSKI, J. S. et al. Functional annotation of chemical libraries across diverse biological processes. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 9, p. 982–993, set. 2017.

QUINTAS-GRANADOS, L. I. et al. Bifunctional activity of deoxyhypusine synthase/hydroxylase from *Trichomonas vaginalis*. **Biochimie**, v. 123, p. 37–51, 1 abr. 2016.

RAMOS, P. R. P. DA S. et al. Natural Compounds as Non-Nucleoside Inhibitors of Zika Virus Polymerase through Integration of In Silico and In Vitro Approaches. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 12, p. 1493, dez. 2022.

ROGERS, B. et al. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 207–214, abr. 2001.

ROSSI, D. et al. Evidence for a Negative Cooperativity between eIF5A and eEF2 on Binding to the Ribosome. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0154205, 26 abr. 2016.

RYAN, O. W. et al. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. **eLife**, v. 3, p. e03703, 19 ago. 2014.

SCHRÖDER, M. et al. Linker-Region Modified Derivatives of the Deoxyhypusine Synthase Inhibitor CNI-1493 Suppress HIV-1 Replication. **Archiv der Pharmazie**, v. 349, n. 2, p. 91–103, 2016.

SCHROEDER, M. et al. In silico Design, Synthesis, and Screening of Novel Deoxyhypusine Synthase Inhibitors Targeting HIV-1 Replication. **ChemMedChem**, v. 9, n. 5, p. 940–952, 2014.

SCHULLER, A. P. et al. eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. **Molecular Cell**, v. 66, n. 2, p. 194–205.e5, 20 abr. 2017.

SFAKIANOS, A. P.; RAVEN, R. M.; WILLIS, A. E. The pleiotropic roles of eIF5A in cellular life and its therapeutic potential in cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 50, n. 6, p. 1885–1895, 13 dez. 2022.

SILVA, S. F. et al. Structural features and development of an assay platform of the parasite target deoxyhypusine synthase of *Brugia malayi* and *Leishmania major*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, p. e0008762, 12 out. 2020.

SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. Screening of 2A peptides for polycistronic gene expression in yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 5, p. foy036, 1 ago. 2018.

SPROUFFSKE, K.; WAGNER, A. Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 172, 19 abr. 2016.

TANAKA, Y. et al. Discovery of Novel Allosteric Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 3215–3226, 26 mar. 2020a.

TANAKA, Y. et al. New Series of Potent Allosteric Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 8, p. 1645–1652, 13 ago. 2020b.

TAUC, M. et al. The eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A1), the molecule, mechanisms and recent insights into the pathophysiological roles. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 219, 24 dez. 2021.

TAVELLA, T. A. et al. Yeast-based high-throughput screens for discovery of kinase inhibitors for neglected diseases. Em: **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. [s.l.] Elsevier, 2021. v. 124p. 275–309.

TONG, A. H. Y. et al. Systematic Genetic Analysis with Ordered Arrays of Yeast Deletion Mutants. **Science**, v. 294, n. 5550, p. 2364–2368, 14 dez. 2001.

UMLAND, T. C. et al. A New Crystal Structure of Deoxyhypusine Synthase Reveals the Configuration of the Active Enzyme and of an Enzyme·NAD·Inhibitor Ternary Complex *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p. 28697–28705, 2 jul. 2004.

VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 1 jun. 2002.

WAȚOR, E.; WILK, P.; GRUDNIK, P. Half Way to Hypusine—Structural Basis for Substrate Recognition by Human Deoxyhypusine Synthase. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 522, abr. 2020.

WHO. **Malaria**. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/malaria>>. Acesso em: 30 jan. 2023a.

WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 30 jan. 2023b.

WICHAPONG, K. et al. Application of Docking and QM/MM-GBSA Rescoring to Screen for Novel Myt1 Kinase Inhibitors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 3, p. 881–893, 24 mar. 2014.

WILLIAMS, K. et al. Cheaper faster drug development validated by the repositioning of drugs against neglected tropical diseases. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 12, n. 104, 6 mar. 2015.

WOLFF, E. C. et al. Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. **Amino acids**, v. 33, n. 2, p. 341–350, ago. 2007.

WOLFF, E. C.; WOLFF, J.; PARK, M. H. Deoxyhypusine synthase generates and uses bound NADH in a transient hydride transfer mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9170–9177, 31 mar. 2000.

WU, G.-Q.; XU, Y.-M.; LAU, A. T. Y. Recent insights into eukaryotic translation initiation factors 5A1 and 5A2 and their roles in human health and disease. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, p. 142, 29 abr. 2020.

YANG, X. et al. Structures and corresponding functions of five types of picornaviral 2A proteins. *Frontiers in Microbiology*. **Frontiers Media S.A.**, , 21 jul. 2017.

ANEXOS

Scripts R:

1- # Extração dos parâmetros métricos de cada curva de crescimento:
#SummarizeGrowthbyplate Suelen 02092023

```
library(growthcurver)

file_name <- "C:/Users/ThinkPad/Desktop/code/filename.txt"
d <- read.table(file_name, header = TRUE, sep = "\t", dec = ".")

gc_out <- SummarizeGrowthByPlate(d)
output_file_name <- "C:/Users/ThinkPad/Desktop/code/filename.xls"
write.table(gc_out, file = output_file_name,
            quote = FALSE, sep = "\t", row.names = FALSE)
plot_file_name = "C:/Users/ThinkPad/Desktop/code/filename.pdf"
gc_out <- SummarizeGrowthByPlate(d, plot_fit = TRUE,
                                plot_file = plot_file_name)

head(gc_out)
```

2- #Plot das curvas de crescimento Pathogen box:
Analyze Bioscreen data

```
## set working directory (can also be done in files viewer)
setwd("C:/Users/ThinkPad/Desktop/code")

## read in data, change table to have time, well and OD columns - not one row per
well
x <- read.table("filename.txt",
               header = T, check.names = F, sep = "\t", dec = ".")
library(reshape)
x <- melt(x, id.vars = "time") # melt using time as variable
names(x) <- c("time", "well", "IF") # rename columns

## Read in metadata (information about each well)
md <- read.table("filename.csv", sep = ";", header = T)
md$well <- as.factor(md$well) # make conditions into factors, R interprets it as
numerical data as default
md$Compound <- as.factor(md$Compound)
md$Concentration <- as.factor(md$Concentration)

## add sample information to the growth data
library(dplyr)
```

```

x <- left_join(x, md, by = "well") # add metadata

## Average of replicates
library(Rmisc)
x_means <- summarySE(x, measurevar = "IF", groupvars = c("strain", "Compound",
"time", "Concentration")) # in groupvars add all factors except well

## Make a column with all factors combined - makes plotting easier
x_means$grp <- paste(x_means$strain, x_means$Compound,
x_means$Concentration, sep = "_")

## Plot curves
library(ggplot2)

# Save main settings in an object
p1 <- ggplot(x_means, aes(x = time, y = IF, grp = grp)) + # grp here is the combined
factor column that we made above
  geom_line(aes(col = Concentration)) +
  geom_point(aes(col = Compound, shape = Concentration), size = 1.8)

# add colours, split by factors etc
library(ggprism) # pretty colours and plot templates
p1 +
  scale_color_prism("viridis") +
  facet_wrap(~Compound, scales = "free") +
  theme_classic(base_size = 12) +
  theme(strip.background = element_blank())

## With own palette
my_palette <- c(
  "#6699CC",
  "#87CEFA",
  "#FF9933",
  "#4169E1"
)

p1 +
  scale_color_manual(values = my_palette) +
  facet_wrap(~Compound, scales = "free") +
  theme_classic(base_size = 12) +
  theme(strip.background = element_blank())

## more colours

# lengths(ggprism_data$colour_palettes) to check palette options and how many
colours are in each

```

```
# preview_theme("muted_rainbow") to check how they look
# https://github.com/EmilHvitfeldt/r-color-palettes - Has a huge list of other palette
packages that can be installed.
```

```
#### SUBSET DATA - tidyverse also is very good if you filter by many variables
WT <- subset(x, strain == "WT") # single variable
WT_means <- summarySE(WT, measurevar = "IF", groupvars = c("strain",
"Compound", "time", "Concentration"))
```

```
ggplot(WT_means, aes(x = time, y = IF, grp = as.factor(paste(strain, Compound,
Concentration)))) +
  geom_line(aes(col = Concentration), size = 1.5) +
  ylim(0,40000) +
  facet_wrap(~Compound, scales = "free") +
  theme_bw()
```

Artigo proveniente desse projeto de pesquisa

Artigo em elaboração: “Yeast target-based platform to identify inhibitors of *Plasmodium vivax* deoxyhypusine synthase”

Artigo publicado: “Structural features and development of an assay platform of the parasite target deoxyhypusine synthase of *Brugia malayi* and *Leishmania major*” (DOI: 10.1371/journal.pntd.0008762; artigo anexado abaixo)