

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

SUELEN FERNANDES SILVA

**Estudo funcional de desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major*
utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae***

ARARAQUARA - SP

2019

SUELEN FERNANDES SILVA

**Estudo funcional de desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major*
utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

ARARAQUARA - SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

S586e Silva, Suelen Fernandes
Estudo funcional de desoxi-hipusina sintase de
Leishmania major utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae*/ Suelen Fernandes Silva. –
Araraquara : [s.n.], 2019
80 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Cleslei Fernando Zanelli

1. Enzimas. 2. *Leishmania*. 3. Doenças negligenciadas.
4. Poliaminas. 5. Inibidores enzimáticos. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estudo funcional de desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major* utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae*"

AUTORA: SUELEN FERNANDES SILVA

ORIENTADOR: CLESLEI FERNANDO ZANELLI

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

Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profª. Drª. FERNANDA ZANOLLI FREITAS

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profª. Drª. ELIZABETH BILSLAND

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 28 de fevereiro de 2019

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha mãe e à minha irmã, pelo carinho, ensinamentos, compreensão e por, mesmo que distantes, sempre estarem presentes.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por guiar meus passos.

Ao meu pai, Albino Fernandes Braga, pelos ensinamentos que levo comigo onde quer que eu vá.

A minha mãe, Gasparina Silva, minha avó, Leontina Francisca da Silva e minha irmã, Bianca Fernandes Silva, pelo amor, dedicação, compreensão e incentivo. É muito gratificante poder dividir esse momento com vocês, que me espelham tanto orgulho e admiração.

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

Aos colegas do laboratório “BioMolVZ”, pela parceria que se expandiu para além do laboratório. Em especial, a Angélica Hollunder Klippel, que há pouco mais de um ano vem me motivado e me acompanhado durante esse trabalho.

Aos pesquisadores do SGC Unicamp, pela infraestrutura e acompanhamento durante os experimentos.

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.

As professoras Dras. Elizabeth Bilsland e Fernanda Zanolli, pelas contribuições e instruções durante a qualificação.

Aos membros da Banca da Defesa, pela disponibilidade e contribuição para a minha formação acadêmica.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq, PADC, FAPESP e INCT Centro de Química Medicinal pelo apoio financeiro e institucional.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca.”

(Paulo Freire)

RESUMO

O fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é altamente conservado em eucariotos e arqueas e sofre uma modificação pós-traducional exclusiva, chamada hipusinação. A enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) atua nessa modificação catalisando a primeira etapa: a transferência da porção 4-aminobutil da molécula de espermidina para um resíduo específico e conservado de lisina de eIF5A. Essa enzima é um bom alvo terapêutico para doenças negligenciadas, tendo em vista suas diferenças estruturais entre espécies de parasitas. Dessa forma, nesse trabalho foi realizado o estudo funcional e caracterização das duas isoformas de DHPS de *Leishmania major*, denominadas de isoforma A (LmDHPSA) e isoforma B (LmDHPSB). Foi realizada a clonagem de diferentes construções dessas proteínas no vetor de expressão em *E. coli* pNIC28-Bsa4. Algumas dessas proteínas foram purificadas em larga escala, mas não apresentaram atividade enzimática *in vitro*. Também foi realizada clonagem dos genes para essas proteínas em vetor de expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, em 3 diferentes construções, pSP-LmDHPSA (contendo a isoforma A), pSP-LmDHPSB (contendo a isoforma B), pSP-LmDHPSAB (contendo as duas isoformas). Apenas o plasmídeo contendo as sequências codificantes para as isoformas A e B de DHPS de *Leishmania major*, pSP-LmDHPSAB, foi capaz de complementar a deleção do gene essencial que codifica DHPS em *S. cerevisiae*, *DYS1*, indicando que essa enzima atue como um heterocomplexo, assim como a enzima de *Trypanosoma brucei*. Essa linhagem de *S. cerevisiae* expressando as enzimas DHPS de *L. major* apresentou taxa de crescimento e hipusinação aproximadamente 25% inferior à linhagem expressando DHPS de humano. Além disso, é possível que existam diferenças entre o sítio de ligação ao GC7 entre essa espécie e a DHPS de humano, uma vez que o análogo estrutural da espermidina, GC7, potente inibidor da DHPS de humano, não apresentou capacidade inibitória significativa na linhagem expressando as enzimas DHPS de *L. major*. Visando investigar a ausência de sensibilidade ao GC7, foram comparados estruturalmente os sítios ativos da DHPS de *Trypanosoma brucei*, *Homo sapiens* e *Leishmania major* (para esta última foi gerado um modelo por homologia). Há uma alta conservação entre os sítios funcionais de DHPS de *L. major* e *T. brucei* com o sítio de *H. sapiens*. No entanto, a isoforma A de *L. major* apresenta grandes extensões em sua sequência, possuindo um total de 601 aminoácidos, enquanto as demais DHPS possuem, aproximadamente 400 aminoácidos. Tais semelhanças e diferenças estruturais serão investigadas futuramente, pois podem levar à descoberta de compostos específicos para DHPS de espécies de *Leishmania*.

Palavras-chave: eIF5A; desoxi-hipusina sintase, *Leishmania major*; GC7.

ABSTRACT

The eukaryotic translation factor 5A (eIF5A) is highly conserved in archaea and eukaryotes and undergoes a unique post-translational modification called hypusination. The enzyme deoxyhypusine synthase (DHPS) acts on this modification by catalyzing the first step: the transfer of the 4-aminobutyl moiety of the spermidine molecule to a specific and conserved residue of lysine in eIF5A. This enzyme is a good therapeutic target for neglected diseases, due to their structural differences among species of parasites. Thus, in this work, the functional study and characterization of the two *Leishmania major* DHPS isoforms, denominated isoform A (LmDHPSA) and isoform B (LmDHPSB) were performed. Cloning of different constructs of these proteins into the *E. coli* expression vector, pNIC28-Bsa4, was performed. Some of these proteins were purified on large scale, but did not show enzymatic activity *in vitro*. Cloning of the genes for these proteins into a *Saccharomyces cerevisiae* expression vector was also performed in 3 different constructs, pSP-LmDHPSA (containing only isoform A), pSP-LmDHPSB (containing only B-isoform), pSP-LmDHPSAB (containing the two isoforms). Only the plasmid containing the sequences coding for both *Leishmania major* DHPS isoforms, pSP-LmDHPSAB, was able to complement the knockout of the essential gene encoding DHPS in *S. cerevisiae*, *DYS1*, indicating that this enzyme acts as a heterocomplex, as well as the *Trypanosoma brucei* enzyme. This strain expressing the *Leishmania major* DHPS enzymes showed a growth rate and hypusination approximately 25% lower than the human DHPS. In addition, it's possible that there are differences between the GC7 binding site between this species and human DHPS, since the structural analog of spermidine, GC7, a potent human DHPS inhibitor, did not show significant inhibitory capacity in the strain expressing the enzymes DHPS of *L. major*. Aiming to investigate the absence of sensitivity to GC7, the active sites were compared the structures of the DHPS active sites from *Trypanosoma brucei*, *Homo sapiens* and *Leishmania major* (for the latter one a homology model was generated). There is high conservation between the functional sites of *L. major* and *T. brucei* compared to the site of the *H. sapiens* DHPS. However, the *L. major* isoform A has large extensions in its sequence, having a total of 601 amino acids, while the other DHPS have approximately 400 amino acids. These structural similarities and differences will be investigated in the future, as they may lead to the discovery of specific compounds able to inhibit DHPS from *Leishmania* species.

Keywords: eIF5A; deoxyhypusine synthase; *Leishmania major*; GC7.

Lista de Figuras

Figura 1.	Representação da conservação entre eIF5A de eucariotos e arqueas.....	15
Figura 2.	Atuação de eIF5A durante a elongação de sequências consecutivas de prolina.....	16
Figura 3.	Modificação pós-traducional de eIF5A em humanos, catalisada pelas enzimas desoxi-hipusina sintase (DHPS) e desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH).....	18
Figura 4.	Alinhamento global entre as sequências de desoxi-hipusina sintases de <i>Leishmania major</i> (LmajorA: XP_001686123.1; LmajorB: XP_001682779.1), <i>Trypanosoma brucei</i> (TbDHSc: XP_822628.1; TbDHSp: XP_001218790.1), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Scerevisiae: NP_011935.1) e <i>Homo sapiens</i> (Hsapiens: NP_001921.1).....	22
Figura 5.	Sobreposição dos resíduos do sítio ativo entre a DHPS de humano e as DHPS de <i>Trypanosoma brucei</i> e representação da complementação do sítio de ligação a NAD ⁺ em <i>Trypanosoma brucei</i>	24
Figura 6.	Ilustração esquemática do vetor de expressão pNIC28-Bsa4 e local da clonagem.....	31
Figura 7.	Esquema representativo da clonagem independente de ligação (LIC).....	32
Figura 8.	Ilustração esquemática do vetor de expressão pSP-GM1 com os locais de inserção dos genes LmDHPSA e LmDHPSB.....	38
Figura 9.	Regiões de domínio “Deoxyhypusine synthase” (pfam01916), nas isoformas A (A) e B (B) de <i>L. major</i>	45
Figura 10.	Alinhamento global entre as sequências de DHPS de <i>Homo sapiens</i> (1RLZ) e as isoformas A (A) e B (B) de DHPS de <i>Leishmania major</i>	46
Figura 11.	Clonagem das construções de DHPS no vetor de expressão pNIC28-Bsa4.....	48

Figura 12.	SDS-PAGE das frações obtidas a partir do teste de expressão em pequena escala.....	50
Figura 13.	Teste de purificação em larga escala da construção LmDHPSA-cb001.....	51
Figura 14.	Segunda tentativa de purificação em larga escala da construção LmDHPSA-cb001.....	52
Figura 15.	Purificação em larga escala das construções LmDHPSB-cb002 e LmDHPSB-cb003.....	54
Figura 16.	Clonagem de construções de DHPS de <i>L. major</i> no vetor de expressão pSP-GM1.....	56
Figura 17.	Complementação funcional da deleção de ScDHPS pelas isoformas de DHPS de <i>Leishmania major</i>	58
Figura 18.	Crescimento e hipusinação diferencial entre as linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> complementadas pela DHPS de <i>Homo sapiens</i> e pelas DHPSs de <i>Leishmania major</i>	60
Figura 19.	Efeito do GC7 no crescimento celular entre linhagens de <i>S. cerevisiae</i> expressando a DHPS de humano e as DHPSs de <i>Leishmania major</i>	62
Figura 20.	Modelo molecular comparativo da desoxi-hipusina sintase de <i>Leishmania major</i>	63
Figura 21.	Representação da interface dos dímeros contendo um sítio de ligação a NAD cataliticamente ativo e outro não funcional.....	65
Figura 22.	Resíduos de ligação à NAD no sítio funcional.....	68
Figura 23.	Resíduos de ligação à NAD no sítio catalicamente não funcional.	69
Figura 24.	Resíduos de ligação à GC7 no sítio catalicamente funcional.....	71
Figura 25.	Resíduos de ligação à GC7 no sítio catalicamente não funcional..	72

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1.	Linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizada nesse trabalho.....	27
Tabela 2.	Linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas nesse trabalho.....	27
Tabela 3.	Plasmídeos utilizados nesse trabalho.....	28
Tabela 4.	Genes usados nesse trabalho.....	28
Tabela 5.	Sequência dos primers utilizados para amplificações da isoforma A da DHPS de <i>L. major</i>	29
Tabela 6.	Sequência dos primers utilizados para amplificações da isoforma B da DHPS de <i>L. major</i>	30
Tabela 7.	Sequência dos oligonucleotídeos usados para amplificação das isoformas A e B de DHPS de <i>L. major</i>	39
Tabela 8.	Anticorpos utilizados nesse trabalho.....	43
Tabela 9.	Combinações de primers e construções geradas para a isoforma A de DHPS de <i>Leishmania major</i> (LmDHPSA).....	47
Tabela 10.	Combinações de primers e construções geradas para a isoforma B de DHPS de <i>Leishmania major</i> (LmDHPSB).....	47
Tabela 11.	Comparação entre os resíduos dos sítios de ligação à NAD entre <i>Homo sapiens</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> e <i>Leishmania major</i> ...	66
Tabela 12.	Tabela 12. Comparação entre os resíduos dos sítios de ligação à GC7 à 6Å de distância entre <i>Homo sapiens</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> e <i>Leishmania major</i>	70
Quadro 1.	Valores obtidos para análises da curva de crescimento da Figura 18.....	82
Quadro 2.	Valores obtidos para análises da curva de crescimento da Figura 19.....	82

Lista de abreviaturas e siglas

%	porcentagem
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
clonNAT	nourseotricina
C-terminal	carboxi-terminal
DDM	<i>n-Dodecil-beta-D-maltoside</i>
DHPS	desoxi-hipusina sintase
D.O.600nm	densidade óptica a 600nm
DOHH	desoxi-hipusina hidroxilase
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eIF5A	<i>eukaryotic translation initiation factor 5A</i>
g	grama
GC7	N1-guanil-1,7-diaminoheptano
h	hora
HEPES	<i>2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid</i>
IMAC	cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
INCT	Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia
kDa	quilodalton
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
LIC	clonagem independente de ligação
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	<i>β-nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	<i>β-nicotinamide adenine dinucleotide reduced</i>
ng	nanograma
Ni-NTA	matriz de ácido nitriloacético-níquel
nm	nanômetros
N-terminal	amino-terminal
pb	pares de base
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS adicionado de 0,05% de Tween-20

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polietilenimina
pH	potencial hidrogeniônico
PCT	centro da peptidil transferase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
rpm	rotações por minuto
s	segundo
SC	meio sintético completo para levedura
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEM	<i>standard error of mean</i>
SGC	<i>Structural Genomics Consortium</i>
TB	meio <i>Terrific Broth</i>
<i>TbDHSc</i>	desoxi-hipusina sintase catalítica de <i>Trypanosoma brucei</i>
<i>TbDHSp</i>	desoxi-hipusina sintase prozima de <i>Trypanosoma brucei</i>
TCEP	<i>Tris(2-carboxyethyl)phosphine</i>
Tris	tris-hidroximetilaminometano (trizma base)
tRNA	RNA transportador
UV	ultravioleta
xg	aceleração gravitacional

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Clonagem das isoformas de DHPS de <i>Leishmania major</i>.....	29
3.1.1. PCR de colônia	32
3.2. Produção das enzimas desoxi-hipusina sintase de <i>Leishmania major</i>.....	33
3.2.1. Ensaio de expressão em pequena escala	33
3.2.2. Expressão da proteína recombinante em larga escala.....	34
3.2.2.1. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)	35
3.2.2.2. Cromatografia de exclusão molecular	35
3.2.2.3. Cromatografia de troca iônica.....	36
3.3. Ensaio da atividade enzimática <i>in vitro</i>	36
3.4. Verificação de complementação de ScDHPS pelas isoformas de desoxi-hipusina sintase de <i>Leishmania major</i>.....	37
3.4.1. Clonagem em vetor de expressão em levedura	37
3.4.2. Digestão do vetor de expressão e dos produtos de PCR.....	39
3.4.3. Reação de ligação do vetor de expressão aos produtos de PCR	39
3.4.4. Transformação de levedura	40
3.4.5. Esporulação e crescimento seletivo dos haploides de interesse para o ensaio de complementação	40
3.4.6. Análise de crescimento comparativo em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.4.7. <i>Western blot</i>	42
3.5. Análise molecular entre os sítios de ligação à NAD⁺ e GC7 em <i>Homo sapiens</i>, <i>Leishmania major</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>.....	44
3.5.1. Geração do modelo molecular por homologia de DHPS de <i>Leishmania major</i>	44
3.5.2. Sobreposição dos sítios de ligação à NAD e GC7	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Clonagem das isoformas de desoxi-hipusina sintase de <i>Leishmania major</i>.....	45

4.2. Purificação das enzimas desoxi-hipusina sintase de <i>Leishmania major</i>	48
4.2.1. Expressão em pequena escala das enzimas DHPS de <i>Leishmania major</i>	48
4.2.2. Expressão em larga escala das enzimas DHPS de <i>Leishmania major</i>	50
4.3. Verificação de complementação de ScDHPS pelas isoformas de desoxi-hipusina sintase de <i>Leishmania major</i>	55
4.3.1. Clonagem em vetor de expressão em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
4.3.2. Análise da capacidade de complementação de DHPS de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pelas enzimas de <i>Leishmania major</i>	56
4.3.3. Análise do crescimento diferencial entre as linhagens complementadas em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
4.3.4. Análise da sensibilidade ao GC7 usando ensaio de crescimento comparativo em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
4.4. Comparação entre os sítios de ligação a NAD⁺ e GC7	61
4.4.1. Geração do modelo molecular por homologia de DHPS de <i>Leishmania major</i>	61
4.4.2. Comparação entre os sítios de ligação a NAD e GC7 de <i>Homo sapiens</i> , <i>Leishmania major</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	63
5. CONCLUSÃO	70
6. REFERÊNCIAS	72
ANEXO I	78
ANEXO II	79

1. INTRODUÇÃO

Durante a expressão gênica, a etapa da tradução é mediada e regulada por vários fatores de tradução, os quais atuam no seu início, alongação, terminação e reciclagem do ribossomo. A maior parte destes fatores são altamente conservados e essenciais para a viabilidade celular (DEVER; DINMAN; GREEN, 2018). Como estes, o fator de tradução eIF5A é altamente conservado em eucariotos e arqueas (Figura 1) e, além disso, é essencial para a viabilidade celular de todos os organismos em que foi estudado até o momento (DEVER; GUTIERREZ; SHIN, 2014; ROSSI et al., 2014).

Figura 1. Representação da conservação entre eIF5A de eucariotos e arqueas.

Alinhamento global entre as sequências de eIF5A de *Haloferax volcanii* DS2 (Arquea: WP_004042193.1), *Trypanosoma brucei* (Tbrucei: XP_828167.1), *Saccharomyces cerevisiae* (Scerevisiae: NP_010880.3) e *Homo sapiens* (Hsapiens: NP_001137234.1). Alinhamento elaborado utilizando as ferramentas online Clustal ômega (<<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>) e BoxShade (<<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>). **Preto:** resíduos de aminoácidos idênticos. **Cinza:** aminoácidos similares. *: Conservação da lisina essencial para a hipusinação.

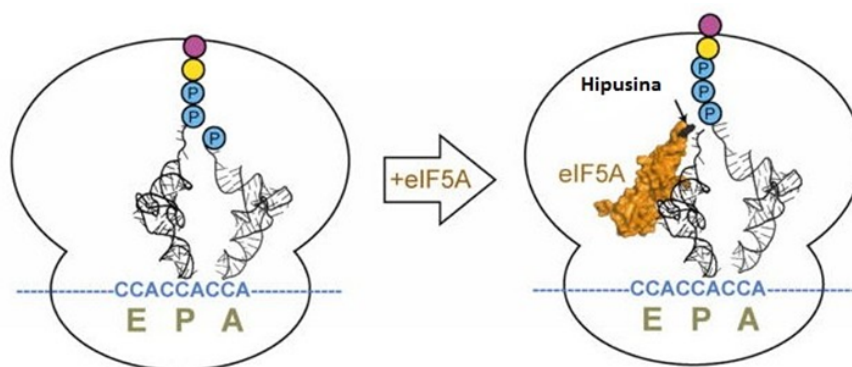
Arquea	1	-----MAKEOKVRELOEGSYVMEEKPCKINAYSTAKPGKHGSAKARV*
Tbrucei	1	MSDDEGQFAEGGAQVGSLLTYPMQAGALKKGGYICINGRPCKVIDLSVSKTGKHGHAKVSI
Scerevisiae	1	MSDEEHTFETA-DAGSSATYPMQCSALRKNGFVVIKSRPCKIVDMSTSKTGKHGHAKVHL
Hsapiens	1	-MADDLDFETG-DAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHL
Arquea	45	EARGVFDSKKRSLSQPVDAKVVPLIERKQGQVVSITGEDA-----QIMDLITYQTF
Tbrucei	61	VALDIFTGNKMEDQAPSTHNVEVPEVKTATYSVLDIQEDREDPSKPAHLSLMDDEGETRD
Scerevisiae	60	VAIDIFTGKKLEDISPSTHNMEVPVVKRNEYQLDIDD-----GFLSLMMDGDTKD
Hsapiens	59	VGIDIFTGKKVEDICPSTHNMDVFNKRNDFOLIGIQD-----GYLSLMDGDSGEVRE
Arquea	97	TMRIPDEEDINPEDEIEYLEYEGQRKIV-----
Tbrucei	121	NLDMPNABLAGQIKEQFD--AGKDLVVVVVSAMGIDQILSFKNAAER-
Scerevisiae	112	DVKAP-EGELGDSLQTAFD--EGKDLMTTISAMGEEAALSFKEAARTD
Hsapiens	111	DLRLP-EGDLGKEIEQKYD--CGEELITVLSAMTEEAATKAMAK--

Um fato que chama atenção para eIF5A é sua modificação pós-traducional exclusiva e necessária para seu funcionamento, conhecida como hipusinação (detalhada mais adiante nesta dissertação; (PARK et al., 2010). Esta modificação

ocorre em uma lisina específica (Lys50 em humanos, Figura 1), a qual é convertida em um resíduo de hipusina (hidroxi-putrescina-lisina) e faz de eIF5A um interessante alvo para desenvolvimento de fármacos, o que será explorado neste projeto.

Inicialmente, eIF5A foi caracterizada como fator de início da tradução, mas estudos subsequentes não reafirmaram esse papel (GANOZA; KIEL; AOKI, 2002). Somente depois de muito tempo, foi demonstrado que eIF5A tem um papel essencial na tradução, no entanto, na etapa de alongação da tradução e não no início (ZANELLI et al., 2006; DIAS et al., 2008; GREGIO et al., 2009). É proposto que eIF5A atue durante a alongação de determinadas sequências de 3 ou mais resíduos que tendem a induzir um tipo de parada (*stalling*) do ribossomo, como, por exemplo, sequências consecutivas de prolinas (Figura 2) (PELECHANO; ALEPUZ, 2017; SCHULLER et al., 2017). Sequências repetitivas de aminoácidos que apresentam rigidez estrutural, como o aminoácido cíclico prolina, podem causar uma conformação estrutural do polipeptídeo em crescimento (ligado ao peptidil-tRNA) que é desfavorável para seu trânsito pelo túnel de saída do ribossomo (ROSSI et al., 2014).

Figura 2. Atuação de eIF5A durante a alongação de sequências consecutivas de prolinas. **Esquerda:** *stalling* ribossomal induzido por sequências repetitivas de prolina. Nesse caso, há uma di-prolina no sítio P (peptidil) e um Pro-tRNA^{Pro} no sítio A (aminoacil). **Direita:** Ligação de eIF5A perto do sítio E (saída), com a cadeia lateral de hipusina adjacente ao peptidil-tRNA no PTC (centro da peptidil-transferase) do ribossomo, onde pode ajudar a promover a formação de ligações peptídicas com o aminoácido ligado ao sítio A (aminoacil). Como descrito em Gutierrez et al., 2013.



Fonte: Adaptado de Gutierrez et al., 2013.

Possivelmente, interações eletrostáticas e outras interações fracas com regiões próximas da entrada do túnel de saída do ribossomo poderiam também causar *stalling* do ribossomo, o que justificaria o *stalling* ribossomal causado por sequências que não contêm prolina (GUTIERREZ et al., 2013). Por fim, foi publicado um trabalho demonstrando que EF-P, um homólogo estrutural de eIF5A em bactérias, atua na correção do posicionamento do peptidil-tRNA contendo duas prolinas consecutivas (e um prolinil-tRNA no sítio aminoacil do ribossomo), estabilizando uma conformação favorável à formação de ligação peptídica pelo PTC (centro da peptidil-transferase) com o resíduo de prolina ligado ao tRNA no sítio aminoacil do ribossomo (HUTER et al., 2017). Devido à semelhança estrutural de eIF5A e EF-P nesta região das proteínas e ao fato de eIF5A se ligar ao ribossomo de forma similar a EF-P, a função de eIF5A na tradução deve ocorrer da mesma forma (SCHMIDT et al., 2016).

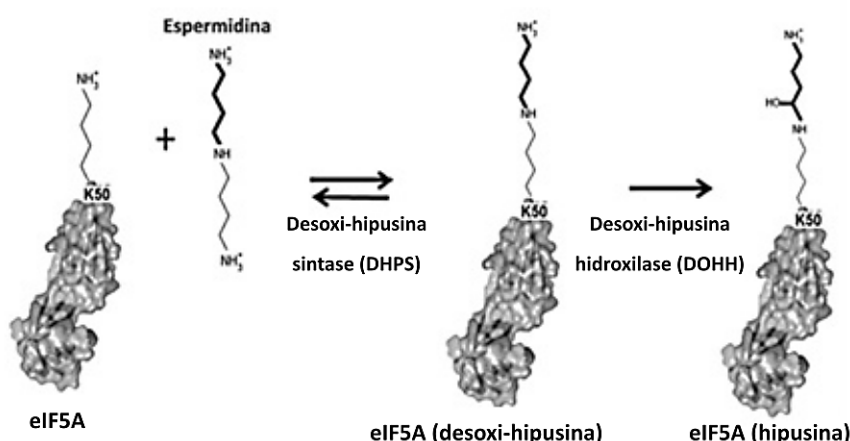
A essencialidade de eIF5A e outros efeitos celulares e fisiológicos da inibição da sua função em diferentes organismos faz com que eIF5A seja um interessante alvo para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Por exemplo, existe extensa literatura de correlação entre a expressão elevada de eIF5A e vários tipos de câncer, a qual acarreta em implicações prognósticas desfavoráveis. Alguns desses estudos também relacionam eIF5A como um marcador tumoral de diagnóstico ou prognóstico (MATHEWS; HERSHEY, 2015; MILLER-FLEMING et al., 2015; NAKANISHI; CLEVELAND, 2016). Em adenocarcinoma ductal pancreático induzido por uma mutação em KRAS, por exemplo, ocorre aumento dos níveis de eIF5A e consequente aumento da tirosina quinase não-receptor PEAK1. O aumento de PEAK1 resulta em um comportamento agressivo em adenocarcinoma ductal pancreático (STRNADEL et al., 2017).

Além disso, a função de eIF5A parece ser necessária para a proliferação e diferenciação de linfócitos T mediadores de inflamação e liberação de citocinas pró-inflamatórias por células do sistema imune inato e que estas correlações biológicas podem ser relevantes para o tratamento de sépsis e diabetes. Nas ilhotas de Langerhans, a depleção de eIF5A leva a tradução prejudicada do mRNA codificador de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), alterando a resposta imune (TAYLOR et al., 2009; ROBBINS et al., 2010; IMAM; MIRMIRA; JAUME, 2014; TERSEY et al., 2014). Por fim, a função de eIF5A também foi associada a replicação viral. Foi

demonstrado que a inibição de eIF5A reduz a replicação dos vírus HIV-1 (HOQUE et al., 2009; LIU et al., 2011) e Ebola (OLSEN et al., 2016).

Como mencionado anteriormente, eIF5A sofre uma modificação pós-traducional única, a hipusinação. A formação do aminoácido hipusina ([Nε-(4-amino-2-hidroxibutil)-lisina]) ocorre em duas etapas, que envolvem a ação de duas enzimas. Primeiramente, a enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) catalisa a transferência da porção 4-aminobutil da molécula de espermidina para o resíduo de lisina 50 de eIF5A, em humanos. A lisina 50 (K50, na Figura 3) previamente modificada é hidroxilada pela desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH), finalizando a maturação de eIF5A (Figura 3). A hipusinação é um processo irreversível, uma vez que a eIF5A modificada permanece assim até a sua degradação (PARK et al., 2010; DE ALMEIDA JR et al., 2014).

Figura 3. Modificação pós-traducional de eIF5A em humanos, catalisada pelas enzimas desoxi-hipusina sintase (DHPS) e desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH). A DHPS transfere o grupo 4-aminobutil da molécula de espermidina para K50 (lisina 50) de eIF5A. DOOH finaliza a modificação realizando uma hidroxilação na porção aminobutil em K50.



Fonte: Adaptado de DE ALMEIDA JR et al., 2014.

Já foram descritas as estruturas e alguns inibidores para ambas as enzimas, no entanto, como a desoxi-hipusina hidroxilase necessita de ferro como cofator, as moléculas inibidoras identificadas para DOHH até o momento são quelantes de íons de Fe (KIM et al., 2006; VU et al., 2009), o que dificulta o processo de triagem de novos inibidores e gera uma inibição não totalmente específica por serem também

inibidores de outras enzimas que usam íons de Fe como cofator. Além disso, apesar de ter sido demonstrada a essencialidade de DOHH em mamíferos, esta enzima não é essencial em *Saccharomyces cerevisiae* (PARK et al., 2006) e *Schizosaccharomyces pombe* (WEIR; YAFFE, 2004; KANG et al., 2007) e não se sabe ainda ao certo o impacto da hidroxilação na função de eIF5A, enquanto já está bem demonstrada a essencialidade da desoxi-hipusinação em todos os organismos testados até o momento (PARK et al., 2010; NISHIMURA et al., 2012).

Além de já existir muito mais informações relacionadas à estrutura e aos resíduos do sítio ativo da desoxi-hipusina sintase, inclusive estruturas cristalográficas já com um inibidor (descrito abaixo), essa enzima utiliza NAD⁺ como cofator e a poliamina espermidina como substrato, facilitando a triagem de inibidores, através de análogos estruturais do substrato, por exemplo (UMLAND et al., 2004). Além disso, recentemente foi publicada a estrutura cristalográfica da DHPS de um organismo patogênico, *Trypanosoma brucei*, aumentando assim as informações a respeito das diferenças estruturais entre as enzimas de humanos e tripanossomatídeos (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018).

Desta forma, o impedimento da maturação de eIF5A por intermédio da inibição da enzima desoxi-hipusina sintase tem sido apontado em diversos estudos como um alvo promissor para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas, principalmente em relação a desordens de proliferação celular e a processos inflamatórios. Diversas estratégias já foram desenvolvidas visando à inibição da desoxi-hipusina sintase (ROBBINS et al., 2010; BANDINO et al., 2014; SCHROEDER et al., 2014; KERSTING et al., 2016).

GC7 (N1-guanil-1,7-diaminoheptano) está entre os mais potentes inibidores conhecidos da DHPS. Esse composto atua competindo com o substrato, espermidina, pela ligação ao sítio ativo da enzima e é considerado um potencial fármaco no tratamento de diabetes e diversos tipos de câncer, entre outras doenças (BANDINO et al., 2014; ZHOU et al., 2017). No entanto, GC7 não possui atuação limitada à inibição de desoxi-hipusina sintase. Foram observados efeitos de GC7, independentes da atividade de eIF5A, desregulando a autofagia basal (OLIVERIO et al., 2014) e interferindo com a biossíntese de poliaminas (LANDAU et al., 2010). GC7 também afeta o início da tradução, competindo com a espermidina em vias enzimáticas ou regulatórias necessárias para a modulação da fosforilação de eIF2 α

e 4E-BP (LANDAU et al., 2010). A falta de seletividade do GC7 implica na necessidade do rastreamento de novas substâncias que sejam mais específicas para DHPS, evitando assim, efeitos não desejados e aumentando o potencial de atuação (SCHRODER et al., 2016).

Os rastreamentos *in silico* e as técnicas de modelagem molecular permitiram a síntese química de outros inibidores da DHPS. O Semapimod (CNI- 1493) e diversos análogos desse composto apresentaram resultados promissores na supressão da replicação do HIV, via inibição dose-dependente da DHPS (SCHRODER et al., 2014, 2016).

A desoxi-hipusina sintase também é considerada alvo terapêutico em outros organismos, como em protozoários e fungos. Há estudos mostrando a inibição da desoxi-hipusina sintase *in vitro*, utilizando GC7, em *Trypanosoma brucei* (NGUYEN et al., 2013, 2015), *Cryptosporidium parvum* (MITTAL et al., 2014) e *Plasmodium falciparum* (KAISER et al., 2007). Curiosamente, GC7 apresentou baixa capacidade inibitória na desoxi-hipusina sintase de *Leishmania donovani*, sugerindo possíveis diferenças no sítio de ligação ao GC7 entre as enzimas de humano e *L. donovani* (CHAWLA et al., 2010). Essas diferenças estruturais entre as enzimas de diferentes organismos podem ser exploradas para o desenvolvimento de moléculas que interajam especificamente com o parasita (CHAWLA et al., 2010, 2012).

Existem, ainda, estudos mostrando a inibição de DHPS em *Fusarium graminearum*, utilizando o composto CNI-1493 (Semapimod) durante a infecção de trigo. Essa inibição foi específica ao patógeno, sem gerar interferências ao desenvolvimento do grão, mostrando que a inibição dessa enzima também possui importância agrônômica (WORIEDH et al., 2011; MARTINEZ-ROCHA et al., 2016).

O alinhamento global das sequências de desoxi-hipusina sintase de diversos organismos permite analisar melhor algumas diferenças e semelhanças estruturais (Figura 4). Os resíduos do sítio ativo que interagem a uma menor distância com GC7, no co-cristal de desoxi-hipusina sintase de humano (ID de entrada no PDB: 1RQD) (UMLAND et al., 2004), são altamente conservados na maioria das espécies e estão destacados em vermelho na Figura 4.

Curiosamente, na maior parte dos organismos com genoma conhecido, incluindo *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Caenorhabditis elegans*, *Plasmodium vivax*,

Schistosoma mansoni, *Drosophila melanogaster* e *Danio rerio* é encontrada apenas uma sequência de desoxi-hipusina sintase, ou seja, apenas um gene. Já em tripanossomatídeos como, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, há mais de uma desoxi-hipusina sintase codificada no genoma.

Em *T. brucei* e *L. major*, observa-se ainda, que apenas uma das isoformas da proteína possui o resíduo de lisina essencial para a atividade de desoxi-hipusina sintase (identificado por seta verde, Figura 4). Além disso, a maioria dos resíduos do sítio ativo que interagem com GC7 na co-cristal de *H. sapiens* (1RQD) só estão conservados em uma das isoformas dessas espécies (*LmajorA* e *TbDHSc*, na figura 4).

Figura 4. Alinhamento global entre as sequências de desoxi-hipusina sintases de *Leishmania major* (LmajorA: XP_001686123.1; LmajorB: XP_001682779.1), *Trypanosoma brucei* (TbDHSc: XP_822628.1; TbDHSp: XP_001218790.1), *Saccharomyces cerevisiae* (Scerevisiae: NP_011935.1) e *Homo sapiens* (Hsapiens: NP_001921.1). Vermelho: Aminoácidos que se ligam ao GC7 a uma distância de 5Å no co-cristal de humanos (ID PDB: 1RQD) (Umland et al., 2004). Alinhamento elaborado utilizando as ferramentas online Clustal ômega e BoxShade (<<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>). Preto: resídidos de aminoácidos idênticos. Cinza: aminoácidos similares. Seta verde: Lisina essencial para a atividade catalítica de DHPS.

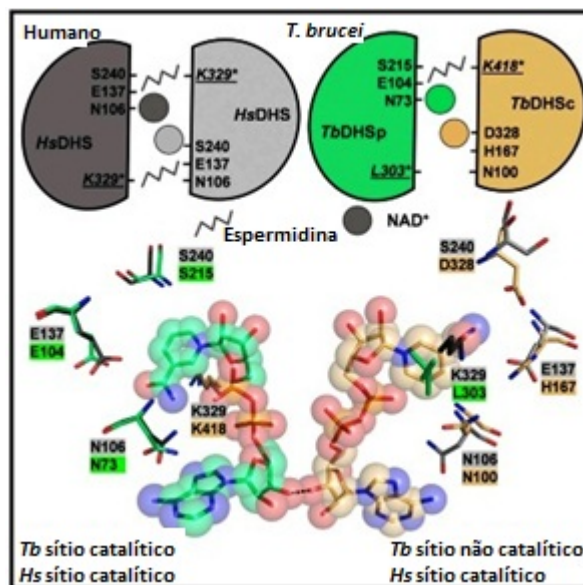
TbDHSc	1	-----MAEIAKSAVLVSSCTDDLIGDAKQVVVG
LmajorA	1	-----MANIAESAVLVSSASSAQAVAKLTQVQG
Hsapiens	1	MEGSLEREAP-----AGALAAVLK---HSTLFPPESTQVRG
Scerevisiae	1	-MSDINEKLP-----EILQDAVLK---ASVPIPDDEFVKVQG
TbDHSp	1	-----MSGVFPFSPRVITGD
LmajorB	1	MLASAPAPREAKKDSAASRRKSASKSTGAAVKDDSSARVSASG---AAESPEQSCSTQVHG
TbDHSc	29	PNQEDL-----HSAEAVLNRYSTVGFQASNLARAFSICEMMLTPQSPSPSLMPTEGDQ-
LmajorA	29	P-TSGF-----DKAQHIIGSYSTMGFQATNYGLARSLAORMIRKOPPSKVYQIKDGKYV
Hsapiens	34	YDFNRG-----VNYRALLEAAGTTGFGQATNEGRAVQQVNAMIEKKLEPLS-----
Scerevisiae	33	IDYSKPEA--TNMRATDLIEAMKTMGFQASSVGTACEIIDSMSRWRGKHID-----
TbDHSp	14	LDYSNLLNIGQEEAIRCVLNAYPNIGLEATNLGRARRIVORALND-----
LmajorB	58	VDFQSLVHATQEEETLRAVVSSLPTTGLQATQIGRARQLVQQIIEH-----
TbDHSc	82	-----ASESPVMVQPTLFVGVGTANLFGTGCREAIRFLCTEIVPLPNGVEPATPL-
LmajorA	82	LVPPDVGEDGRTLQQEHVYPNLFMGVSANLMGTGCREAVRFLVQEGVAHRSPEASAAASA
Hsapiens	79	-QDEDQHADLTQSRRLPTSCITFLGYTSNLISSGITRETIRYLVOHNM-----
Scerevisiae	82	-ELDDHEKKKGCDFDEEGYQKTTIFMGYTSNLISSGVRETIRYLVOHKM-----
TbDHSp	59	-----NGMDGNKVMLAYTSNLISSGLRDTFACLAAREN-----
LmajorB	103	-----RS-PEDRVFLAYTSNMISCCGLRDTFTYLARERI-----
TbDHSc	131	---DD-----MAGIS---CDGTGALKPSPCDSRALIHVLVVS SGAMEHDIRRACESYKL
LmajorA	142	DGTDDQLMFARLKREYVETYGGPPHPDEEV PRAHSFLCAIVVSGGGVEHDLRRACTAYTL
Hsapiens	125	-----VDVLVTIAGGVEEDLIKCLAPTLYL
Scerevisiae	128	-----VDAVVT SAGGVEEDLIKCLAPTLYL
TbDHSp	92	-----IGAVVTIAGGVEEDVIKCLGDTLV
LmajorB	135	-----VDCFISSAGGIEEDVIKCGESTLL
TbDHSc	179	SRDGAEEEGEQF-----HHPVERDRSRSGTDCHEFGNVRYNSSGVAS
LmajorA	202	HYIASEAQGHVSSTISSEATAPLEGLQQRAETPLGTGAAAGAAKPAIFGNVEYPPQGS PG
Hsapiens	149	GEFSLRG-----KELRENGINRIGNLLVPNDNY--
Scerevisiae	152	GEFALKG-----KSLRDQGMNRIGNLLVPNDNY--
TbDHSp	116	GDFALND-----HALRNNGLNRVGNLLVPNDNY--
LmajorB	159	GQFGLDG-----RALRRRGINRIGNLLVPNDNY--
TbDHSc	221	RNLFSCVMRCVLVKRLAEARKEKANREAAPIPEAYYDVCSWAITPSTLWYMAGLWMADIF
LmajorA	262	SALFDRIMRTFAQRLCARQARLRAAAMAKPIPKYDDVCSWSVTPSEVWALCGLWVDMIL
Hsapiens	177	-CKFEDWLMPIILDQVMVEQN-----TEGVWTPSKMIARLGKET----
Scerevisiae	180	-CKFEWIVPILDKMLEEQDEYVKKHGAD-CLEANQDVDSPIWTPSKMIDRFGKET----
TbDHSp	144	-RNFEDEFVPIILRLHEQQQDSR-----WTKTTPSQIIAEIGAAI----
LmajorB	187	-CWFEDEFVPIVLESVQEAQRASR-----WKTHTAPSEFIEMGAAT----

TbDHSc	281	TEALQETGEVT-----DEKVASEEGLKRAKSTVL
LmajorA	322	AEALRAVQSCPSHLTSGSGVGTAEVSTANGKGQEADRAHIATSALYRAEALARARTTVV
Hsapiens	215	-----N-----NPESVY
Scerevisiae	234	-----N-----DESSVL
TbDHSp	184	-----ESVRPNDCGSSLI
LmajorB	227	-----AKNHPDTCTSSLV
TbDHSc	310	YWAARNGVPIFSPSLTDGDIIMFILTAGD-----
LmajorA	382	YWAAVQVSLFSPSFVDGDIITSYLPTVPVPAARPAHRKGGSVADESAANSKELKRRRKAS
Hsapiens	222	YWAQKNHPIPVFSPALTDGSLGDMIFFHSYK-----
Scerevisiae	241	YWAHKNKIPFQPSLTDGSGIDMIFFTFK-----
TbDHSp	197	YWCYRNDIPVFSPAFTDGSMDMIYFYNYN-----
LmajorB	240	YWCYRNGISVFSPAFTDGSMDMIYFYNF-----
TbDHSc	339	-----TGVPLQLQDLVADIHRLNRLAMR---SRRTGMILGGGVVKHHVON
LmajorA	442	SSSPTAATAVEDEPPVVERLQDLVDRDVSINKLAML---SKRTGMILCGGGVVKHHVCN
Hsapiens	252	-----NP---GLVLDIVEDLRLINTQATF---AKCTGMILGGGVVKHHTAN
Scerevisiae	271	-----ASPQLRLVDIVGDIRKINSMSMA---AYRAGMIILGGGLIKHHIAN
TbDHSp	227	-----RKGLVVDVPDVRRLRLQCKSTNVGRITCIVLGAGLPKHHLR
LmajorB	270	-----HKGLVVDPLEDVRLRLKLAKE---KGRNLATVLGGLLPKHHLR
TbDHSc	382	ANLMRNGADYAVFLNNAQEFDGSDAGARPGEAWSWCKLRLDSTAVKVYSEVTIVFPLIVV
LmajorA	499	ANLMRNGADEFTILNNGQEFDGSDAGAKPEEALSWGKVRMEGAFVKVYGEVSTYLPPLVA
Hsapiens	293	ANLMRNGADYAVYINTAQEFDGSDSGARPDEAVSWGKIRVDAQPVKYADASIVFPLIVA
Scerevisiae	314	ACLNRNGADYAVYINTGQEFYDGSDAGARPDEAVSWGKIKAEAKSVKLFADVTIVLPLIVA
TbDHSp	271	N---VQADAVVYVTTGSDAGCCSSCNVMADRANGLLSPNCDDVVRVHGDATAIISPLLLL
LmajorB	312	N---VSMDAVVMVTTGLEADCCVSSGVLADDVACGLLREETETVRVQGDATVVFPLMLI
TbDHSc	442	HVFVAVVRMMRSKGKENIRS-----
LmajorA	559	DVFVPAVRQREATDDAQPRRRQSSRGARLPQDVSGHSHLCRGE
Hsapiens	353	ETFAQKMDAFMHEKNED-----
Scerevisiae	374	ATFASGKPKKVKVN-----
TbDHSp	327	RSSDGKEKVGVRREDGN-----
LmajorB	368	AEKAATLEGAAA-----

Em *T. brucei*, as duas desoxi-hipusina sintases apresentam atividade catalítica altamente reduzida em relação à enzima de *H. sapiens*, uma delas, a *TbDHSp* pode inclusive ser considerada inativa, incapaz de se ligar ao substrato (NGUYEN et al., 2013). No entanto, a união desses dois parálogos forma um heterotetrâmero ativo, uma vez que as enzimas possuem resíduos complementares para o sítio de ligação a NAD⁺ (Figura 5) (NGUYEN et al., 2013; AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018). Como *L. major* apresenta ortólogos tanto de *TbDHSc* como de *TbDHSp* (Figura 4), provavelmente estes funcionem de maneira semelhante a *T. brucei*. Além disso, em *L. major*, a isoforma possuindo um sítio ativo completo (*LmajorA*, Figura 4) possui longas inserções em sua sequência, as quais fazem com que esta tenha uma extensão de 601 resíduos, enquanto a maior parte das desoxi-hipusina sintases dos outros organismos e as isoformas não catalíticas de desoxi-hipusina sintase de tripanossomatídeos, são compostas por menos de

400 resíduos (Figura 4).

Figura 5. Sobreposição dos resíduos do sítio ativo entre a DHPS de humano e as DHPS de *T. brucei* e representação da complementação do sítio de ligação a NAD^+ em *T. brucei*. *TbDHSp*: isoforma não funcional, *prozyme*. *TbDHSc*: isoforma funcional. *HsDHS*: DHPS de *Homo sapiens*. As sequências de *HsDHS*, *TbDHSp* e *TbDHSc* estão demonstradas na Figura 4.



Fonte: Adaptado de AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018.

A determinação da estrutura tridimensional das desoxi-hipusina sintases de diferentes eucariotos patogênicos é objetivo do projeto de doutorado de outra aluna do laboratório, como parte do projeto "INCT 2014: Centro de Química Medicinal de Acesso Aberto" (FAPESP 14/50897-0). Dessa forma, serão buscadas diferenças estruturais entre as enzimas desoxi-hipusina sintases de organismos patogênicos em relação à enzima de humanos que possam ser utilizadas no desenho de inibidores que sejam mais ativos com relação as primeiras (PINHEIRO; EMERY; NONATO, 2013).

A busca de inibidores através de rastreamento de coleções de moléculas pequenas *in silico* e em ensaios enzimáticos *in vitro* também constituem importantes estratégias para a descoberta de novos possíveis agentes terapêuticos (COUÑAGO et al., 2017; SANTIAGO et al., 2018). Além da possibilidade da execução de ensaios enzimáticos *in vitro*, já foi utilizada a estratégia de busca de inibidores de coleções de moléculas pequenas através da inibição diferencial de crescimento de linhagens

de *S. cerevisiae* complementadas com enzimas de humano ou de organismos patogênicos. Com esta estratégia ficou demonstrada sua capacidade de analisar o efeito de mutações no gene de um alvo conhecido que levam à resistência a um inibidor utilizado na terapêutica e comparação na suscetibilidade de enzimas ortólogas a um mesmo inibidor (BILSLAND et al., 2016, 2018).

Dadas semelhanças estruturais e evolutivas entre a enzima DHPS de *T. brucei* e das espécies de *Leishmania*, consideramos aqui a possibilidade de que DHPS de *Leishmania* também atuem como um heterotetrâmero. Por outro lado, DHPS de *Leishmania* apresentam uma das subunidades com várias extensões e essas diferenças estruturais não foram ainda estudadas. Assim, esse projeto buscou o estudo funcional e a caracterização das enzimas desoxi-hipusina sintase de *L. major* *in silico* e utilizando o organismo modelo *S. cerevisiae*.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho consistiu no estudo funcional e caracterização das enzimas desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major* *in silico* e utilizando o organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Para o alcance de tal finalidade, foram executados os seguintes objetivos específicos:

- Clonagem dos genes de desoxi-hipusina sintase de *L. major*;
- Produção das enzimas desoxi-hipusina sintase de *L. major*;
- Verificação da complementação de DHPS de *S. cerevisiae* pelas enzimas desoxi-hipusina sintase de *L. major*;
- Análise da sensibilidade ao GC7 usando ensaio de crescimento comparativo em *S. cerevisiae*;
- Análise molecular, *in silico*, entre os sítios de ligação a NAD⁺ e GC7 em *H. sapiens*, *L. major* e *T. brucei*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos – UNESP, Campus Araraquarara e no SGC (*Structural Genomics Consortium*) na UNICAMP. 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 (AUSUBEL et al., 2012). As linhagens, plasmídeos e genes usados nesse trabalho estão descritos nas tabelas a seguir:

Tabela 1. Linhagem de *S. cerevisiae* utilizada nesse trabalho.

Linhagem	Plasmídeo	Genótipo	Origem
VZL 1444	-	<i>MATα / Mata can1pr::TDH3pr-E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr-LEU2* / CAN1 lyp1Δ / LYP1 HYP2::natMX4 / HYP2 pdr5Δ::kanMX / PDR5 dys1Δ::HIS3 / DYS1 leu2Δ / leu2Δ his3Δ / his3Δ ura3Δ / ura3Δ met15Δ / met15Δ</i>	Coleção do Lab. de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos ¹
VZL 1446	pSP-GM1-LmDHP SAB	<i>Mata can1pr::TD3pr-E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ pdr5Δ::kanMX dys1Δ::HIS3 ura3Δ his3Δ met15Δ [HsDHPS/URA3]</i>	Coleção do Lab. de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos ²
VZL 1447	pCM18 8-HsDHP S	<i>Mata can1pr::TD3pr-E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ pdr5Δ::kanMX dys1Δ::HIS3 ura3Δ his3Δ met15Δ [LmDHPSAB/URA3]</i>	Coleção do Lab. de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos ²

* *STE2pr-LEU2* corresponde ao gene selvagem *LEU2* de *S. cerevisiae*, controlado pelo promotor do gene *STE2* de *S. cerevisiae* (ativo apenas em linhagens do tipo *MAT α*), que complementa o nocaute de *LEU2* de *S. cerevisiae*.

¹ Linhagem gerada durante o mestrado da aluna Ana Carolina Silva Paiva (Dados não publicados, mestrado em andamento).

² Linhagens geradas nesse trabalho, como descrito em Materiais e Métodos (tópico 3.4).

Tabela 2. Linhagens de *E. coli* utilizadas nesse trabalho.

Linhagens	Genótipo	Origem
MACH-1	<i>F- φ80(lacZ)ΔM15 ΔlacX74 hsdR(rK-mK+) ΔrecA1398 endA1 tonA</i>	ThermoFisher
DH5α	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	ThermoFisher
BL21 (DE3)-pRARE2	<i>F ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam^R)</i>	ThermoFisher
BL21 – pGKJE8 (groES-groEL)	<i>F- , ompT, hsdSB(rB - mB -), gal, dcm pGKJE8 (Cm^R)</i>	Takara Bio

Tabela 3. Plasmídeos utilizados nesse trabalho.

Plasmídeo	Nome do plasmídeo na coleção BioMoIVZ	Características	Origem
pNIC28-Bsa4	-	<i>pBR322ori-F, kanR, sacB</i>	SGC (STOLS et al., 2002)
pSP-GM1	pVZ1682	<i>2 μ, URA3</i>	Coleção do laboratório (CHEN et al., 2012)
pCM188-HsDHPS	pVZ1691	<i>HsDHPS; vetor CEN, URA3, com promotor reprimível por tetraciclina</i>	Elizabeth Bilsland (Unicamp) (BILSLAND et al., 2016)

Tabela 4. Genes usados nesse trabalho.

Nome do gene utilizado na dissertação	Nome oficial do gene segundo o NCBI	Gene ID/ UNIPROT ID	Organismo
Isoforma A/ LmDHPSA	<i>DHS34</i>	5654787/ Q4Q3H5	<i>Leishmania major</i>
Isoforma B/ LmDHPSB	<i>LMJF_20_050</i>	5651301/ Q4QD19	<i>Leishmania major</i>

HsDHPS	DHPS	1725/ P49366	<i>Homo sapiens</i>
DYS1	DYS1	856465/ P38791	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TbDHSc	Tb10.70.4900	3662232/ Q38BX0	<i>Trypanosoma brucei</i>
TbDHSp	TB927.1.870	4357125/ Q4GZD1	<i>Trypanosoma brucei</i>

3.1. Clonagem das isoformas de DHPS de *L. major*

Para a amplificação dos genes de interesse, foram projetadas construções de primers (Tabelas 5 e 6) que amplificassem tanto as sequências completas (*full-length*), como sequências que gerassem proteínas truncadas, com remoções de regiões possivelmente desorganizadas, o que pode favorecer a obtenção destas proteínas de forma recombinante a partir de *E. coli* e a formação de estruturas compactas para futuros ensaios de cristalização. Esse trabalho foi executado em colaboração com o SGC (*Structural genomics consortium*, UNICAMP).

Para projetar essas construções, identificou-se o homólogo mais próximo para essas proteínas no Banco de Dados de Proteínas (PDB), via alinhamento local usando a ferramenta BLASTp. Foi realizado um alinhamento global entre as sequências de DHPS de *L. major* e o homólogo mais próximo no PDB, utilizando o software de predição de estrutura secundária *GenThreader*, para determinação das regiões necessárias para manutenção da estabilidade da estrutura.

Tabela 5. Sequência dos primers utilizados para amplificações da isoforma A da DHPS de *L. major*. As sequências “LIC” complementares ao vetor pNIC28-Bsa4, importantes para a execução da clonagem independente de ligação (LIC), estão sublinhadas.

Primers para isoforma A de DHPS de <i>L. major</i>	Sequências dos primers	Posição de amplificação
LmDHPSA – Foward 1	<u>TACTTCCAATCCATGGCGAATATTGCGGAGTCTG</u> C	Met 1
LmDHPSA – Reverse 1	<u>TATCCACCTTTACTGTCA</u> TTCTCCACGACACAGG TG	Glu 601
LmDHPSA – Reverse 2	<u>TATCCACCTTTACTGTCA</u> GGAGACGTCTTGCGG CAG	Ser 592

LmDHPSA – <i>Reverse</i> 3	<u>TATCCACCTTTACTGT</u> CACGAGGATTGCCTCCTG CG	Ser 582
LmDHPSA – <i>Reverse</i> 4	<u>TATCCACCTTTACTGT</u> CACGGCTGCGCGTCGTC CGT	Pro 576

Tabela 6. Sequência dos *primers* utilizados para amplificações da isoforma B da DHPS de *L. major*. As sequências “LIC” complementares ao vetor pNIC28-Bsa4, importantes para a execução da clonagem independente de ligação (LIC), estão sublinhadas.

Primers para isoforma B de DHPS de <i>L. major</i>	Sequências dos <i>primers</i>	Posição de amplificação
LmDHPSB – <i>Foward</i> 1	<u>TACTTCCAATCCATG</u> CTTGCCTCTGCCCCAGC	Met 1
LmDHPSB – <i>Foward</i> 2	<u>TACTTCCAATCCATG</u> CCGGCCAAGAAGGACTCC	Pro 10
LmDHPSB – <i>Foward</i> 3	<u>TACTTCCAATCCATGT</u> CCGCTGCGTCCCGTAGG	Ser 15
LmDHPSB – <i>Foward</i> 4	<u>TACTTCCAATCCATGA</u> AGGATGACTCATCAGCGAG AGT	Lys 32
LmDHPSB – <i>Reverse</i> 1	<u>TATCCACCTTTACTGT</u> CACGCTGCAGCCCCCTCCA G	Ala 379

As amplificações dos genes, LmDHPSA e LmDHPSB (Tabela 4), que codificam as duas isoformas de DHPS de *L. major* foram realizadas por PCR, utilizando como molde o DNA genômico isolado da forma promastigota de *L. major strain Friedlin* disponível no SGC - UNICAMP (doação do Dr. Sergio Schenkman). Para a reação de PCR utilizou-se: tampão 1 X da Phusion Polymerase, 200 µM de dNTP mix, 50 ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo e 1 U/50 µL de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB), em um volume final de 50 µL. Todos os insertos foram amplificados com *primers* que incluíam a sequência LIC específica para o vetor pNIC28-Bsa4 (sublinhadas nas Tabelas 5 e 6). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e purificados utilizando *Pure link PCR purification kit* (Invitrogen). Os produtos purificados de PCR foram clonados no vetor de expressão pNIC28-Bsa4 (Figura 6, Tabela 3), usando clonagem independente de ligação (LIC) (Figura 7) (STOLS et al., 2002), de acordo com as etapas descritas a seguir. O vetor foi linearizado através da clivagem em

dois locais, usando a enzima de restrição *BsaI*. Os fragmentos de PCR e o pNIC28-Bsa4 linearizado foram incubados com a enzima T4 DNA polimerase, no entanto o inserto foi incubado com a enzima + dCTP e o vetor com a enzima + dGTP, o que gerou extremidades fitas simples complementares entre inserto e vetor que anelavam entre si. Os plasmídeos recombinantes passaram por transformação por choque térmico usando as células competentes de *E. coli* MACH 1 (ThermoFisher Scientific) (Tabela 2). As células foram semeadas em meio LB sólido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl, 20 g/L de ágar) contendo 50 µg/mL de canamicina e 5% de sacarose. A sacarose foi adicionada ao meio porque os sítios LIC no vetor pNIC28-Bsa4 são separados por um fragmento *stuffer* que contém o gene *sacB* de *Bacillus subtilis* (Figura 6), o qual permite a seleção negativa em meio sólido contendo 5% de sacarose. A clonagem foi confirmada por PCR de colônia e por sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

Figura 6. Ilustração esquemática do vetor de expressão pNIC28-Bsa4 e local da clonagem. Este vetor é derivado do sistema pET e utiliza promotor de bacteriófago T7 (para ser utilizado com a linhagem de *E. coli* BL21 DE3), possui *tag* para proteína de fusão com 6xHis na região N-terminal e sítio de clivagem para a protease TEV após o *tag*. No processo de clonagem “LIC”, a marca de seleção negativa *sacB* é substituída pelos produtos de PCR codificando para as sequências de DHPS (como descrito em Stols et al., 2002). Elaborado utilizando o software SnapGene Viewer.

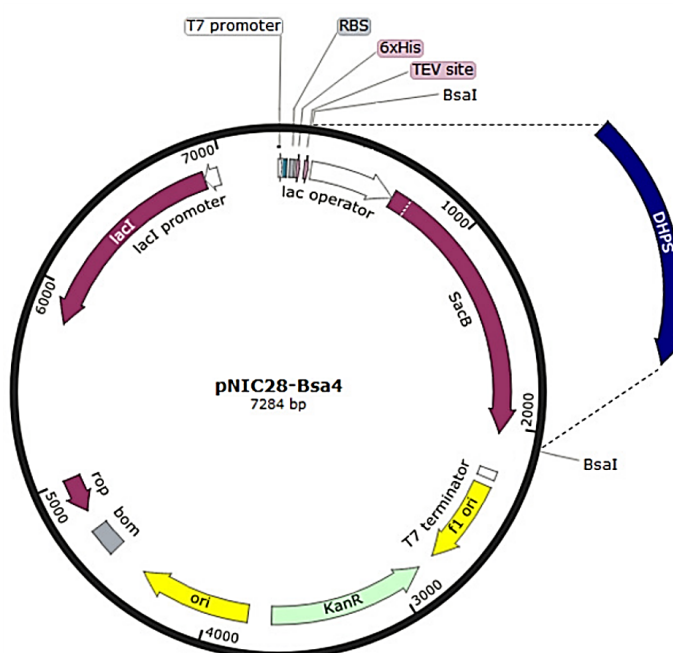
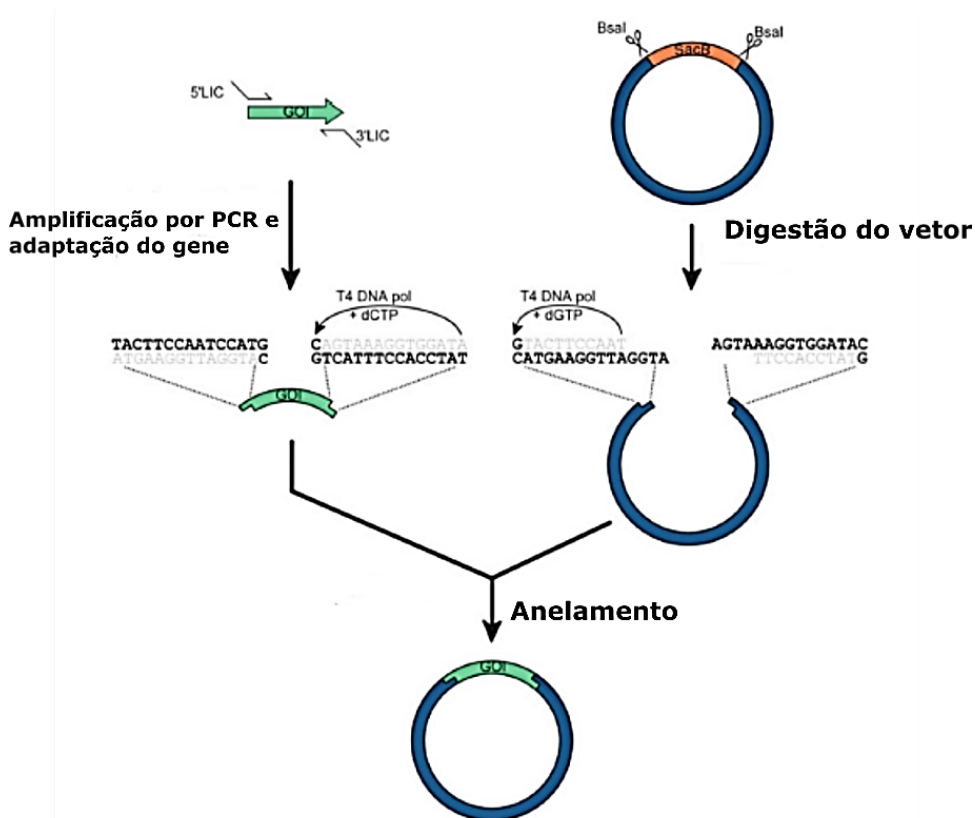


Figura 7. Esquema representativo da clonagem independente de ligação (LIC). O gene de interesse (GOI) é amplificado com *primers* que incluem a sequência LIC específica do vetor. O vetor é linearizado através da digestão com *BsaI*, removendo o gene *sacB*. Inserto e vetor são tratados com T4 DNA polimerase, criando extremidades fitas simples (*overhangs*), o que torna possível uma hibridização de extremidades de vetor+inserto. Por fim, é feita uma transformação usando *E. coli* (como descrito em Stols et al., 2002).



Fonte: Adaptado de <<https://www.thesgc.org/groupprofile/9500>>.

3.1.1. PCR de colônia

As reações para PCR de colônia continham: tampão 1 X da GoTaq DNA Polimerase (Promega), 200 µM de dNTP mix, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 1U/50 µL de GoTaq DNA polimerase (Promega) uma colônia proveniente da transformação como DNA molde, em um volume final de 25 µL. Os oligonucleotídeos utilizados anelam no vetor pNIC28-Bsa4. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5%.

As colônias utilizadas na reação de PCR foram inoculadas em meio LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) contendo 50 µg/mL de canamicina, mantendo a 37°C sob agitação a 700 rpm por 12 h para posterior

purificação dos plasmídeos recombinantes, confirmados pela PCR de colônia, utilizando as especificações do *PureLink Quick Plasmid Miniprep kit* (Invitrogen).

3.2. Produção das enzimas desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major*

3.2.1. Ensaio de expressão em pequena escala

Para encontrar as melhores condições de expressão para a produção das isoformas de DHPS de *L. major*, todos os clones positivos foram avaliados por testes de expressão em pequena escala. As condições do teste foram adaptadas de SAVITSKY et al., 2010.

Os vetores pNIC28-Bsa4 carregando as construções de DHPS passaram por transformação usando as células de *E. coli* BL21 (DE3)-R3-pRARE2 (Tabela 2) para gerar clones de expressão (Savitsky et al., 2010). Foram preparados inóculos dos clones em 1 mL de meio LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl) contendo 50 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol num bloco de 96 poços (Sarstedt) e foi realizado o cultivo *overnight* num agitador de microplacas (Titramax 101, Heidolph) a 37°C, agitando a 700 rpm. Posteriormente, 20 µL dessas culturas saturadas foram inoculadas em 1 mL de meio *Terrific broth* (1,2% de triptona, 2,4% de extrato de levedura, 0,5% de glicerol, 0,17 M de KH₂PO₄ e 0,72 M de K₂HPO₄) contendo 50 µg/mL de canamicina e incubadas a 37°C, a 700 rpm, até atingir densidade óptica em 600nm (DO_{600nm}) de 2-3. A composição do meio variou durante os experimentos visando à obtenção de proteínas mais solúveis (descrito nos resultados).

Em seguida, a expressão foi induzida pela adição de 0,1 mM de IPTG e as culturas foram incubadas a 18°C por 16 horas, a 700 rpm. As células foram coletadas por centrifugação (3000 xg durante 20 min) e ressuspensas em 200 µL de tampão de lise (50 mM de HEPES pH 7,5; 500 mM de NaCl; 10% de glicerol; 10 mM de imidazol; 1 mM de TCEP), contendo 0,1% de DDM (n-dodecil-β-maltosídeo), coquetel inibidor de protease (Protease inhibitor cocktail set III, EDTA free, Calbiochem) a uma proporção de 1:200 do volume final, 0,5 mg/mL de lisosima e 50 U/mL de Benzonase Nuclease (Sigma). Após o congelamento das células suspensas, a -80°C por 20 min, o bloco foi colocado à temperatura ambiente por aproximadamente 15 min, permitindo seu descongelamento. O lisado foi clarificado por centrifugação (3000 xg, durante 10 min) e o sobrenadante foi transferido para

uma placa de filtração de 96 poços (Millipore) contendo 50 µL de resina Ni-NTA (QIAGEN). A placa foi incubada num agitador de microplacas (Titramax 101, Heidolph) a 18°C durante 1h, a 400 rpm. A resina foi lavada com 200 µL de tampão de lavagem (50 mM de HEPES pH 7,5; 500 mM de NaCl; 10% de glicerol; 30 mM de imidazol; 1 mM de TCEP) e centrifugada a 300 xg durante 1 min. O procedimento de lavagem foi repetido mais três vezes. Finalmente, 40 µL de tampão de eluição (50 mM de HEPES pH 7,5; 500 mM de NaCl; 10% de glicerol; 300 mM de imidazol; 1 mM de TCEP) foram adicionados a cada poço e as proteínas foram eluídas da resina por centrifugação a 300 xg durante 3 min. Para avaliar a purificação de cada proteína recombinante, o extrato total celular e as frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE 12%.

3.2.2. Expressão da proteína recombinante em larga escala

As proteínas com maiores níveis de solubilidade passaram para purificação em uma escala aumentada para 6 L de cultura. A expressão e purificação seguiram as etapas descritas abaixo.

Os pré-inóculos, contendo 50 mL de cultura foram crescidos *overnight*, a 37°C a 150 rpm, em meio LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl) acrescido de 50 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol. Essas culturas foram inoculadas em 4 frascos contendo 1,5 L de meio TB (1,2% de triptona, 2,4% de extrato de levedura, 0,5% de glicerol, 0,17 M de KH₂PO₄ e 0,72 M de K₂HPO₄) acrescido de 50 µg/mL de canamicina, as quais foram cultivadas a 37°C, sob agitação de 150 rpm. Ao atingir uma densidade ótica (DO_{600nm}) de aproximadamente 1,5, as culturas foram transferidas para uma temperatura de 18°C. Após 30 minutos aclimatando nessa temperatura, o indutor IPTG foi adicionado a uma concentração de 0,2 mM e a cultura foi incubada *overnight*, a 150 rpm. As células foram coletadas por centrifugação (15 min, 400 rpm, 4°C) e o pellet foi ressuspendido em uma proporção de 1 mL por grama de pellet de tampão de lise 2x (0,1 M de HEPES pH 7,5; 1 M de NaCl; 20% de glicerol; 20 mM de imidazol; 2 mM de TCEP) suplementado com uma proporção de 1:200 do volume final de coquetel inibidor de protease livre de EDTA (Merck Millipore) e congelado a -80°C até o uso.

3.2.2.1. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

As células foram descongeladas e lisadas por sonicação (*Sonics Vibra Cell VCX750 ultrasonic cell disrupter*) por um ciclo de 4 min (5 s on, 10 s off - amplitude = 35%). Uma concentração de 0,15% de PEI (Polietilenimina) foi adicionada ao lisado celular antes da clarificação por centrifugação (45 min, 4000 xg, 4°C). Alíquotas das frações do lisado celular e sobrenadante obtido após clarificação por centrifugação foram coletadas para análise em SDS-PAGE 12%. As proteínas alvos foram purificadas a partir do lisado celular clarificado através de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) utilizando o sistema ÄKTA (GE) em coluna de 5 mL *HisTrap FF Crude*. O sistema foi programado para 3 mL/min. As frações do *flow-through* e as frações eluídas (50 mM de HEPES pH 7,5; 0,5 M de NaCl; 300 mM de imidazol; 10% de glicerol; 1 mM de TCEP) foram coletadas para análise em SDS-PAGE 12%. O conteúdo eluído em 300 mM de imidazol foi dialisado contra um excesso de tampão de gel filtração (20 mM de HEPES pH 7,5; 0,5 M de NaCl; 5% de glicerol; 1 mM de TCEP), *overnight* a 4°C em membrana de diálise. TEV protease também foi adicionado à membrana de diálise (numa proporção 15:1 de DHPS para TEV). As proteínas recombinantes com a cauda de histidina removida mediante tal tratamento com TEV protease foram purificadas utilizando um IMAC “reverso” em colunas de cromatografia (cat. Number 7311550 – Bio-Rad) contendo 1 mL de resina *Ni²⁺-loaded Chelating Sepharose Fast Flow*. As frações *flow-through*, lavagem com 30 mM de imidazol (50 mM de HEPES pH 7,5; 0,5 M de NaCl; 30 mM de imidazol; 10% de glicerol; 1 mM de TCEP) e eluição com 300 mM de imidazol (50 mM de HEPES pH 7,5; 0,5 M de NaCl; 300 mM de imidazol; 10% de glicerol; 1 mM de TCEP) do IMAC reverso foram coletadas para análise em SDS-PAGE 12%. As frações contendo a proteína de interesse foram reunidas e concentradas até um volume final de 5 mL.

3.2.2.2. Cromatografia de exclusão molecular

As amostras foram clarificadas por centrifugação (10 min, 15000 rpm, 4°C) e injetadas em uma coluna pré-equilibrada HiloLoad 16/600 Superdex 200 pg em tampão de gel filtração (20 mM de HEPES pH 7,5; 0,5 M DE NaCl; 5% de glicerol; 1 mM TCEP), conectadas ao sistema ÄKTA (GE) programado a 0,8 mL/min. Alíquotas dos

poços contendo as amostras foram coletadas, separadamente, para análise em SDS-PAGE 12%.

3.2.2.3. Cromatografia de troca iônica

Para remoção das proteínas contaminantes, para algumas proteínas foi necessária uma nova cromatografia. As amostras eluídas em tampão de gel filtração (20 mM de HEPES pH 7,5; 0,5 M de NaCl; 5% de glicerol; 1 mM de TCEP) foram reunidas e submetidas a cromatografia de troca aniônica. O pI das proteínas submetidas a tal processo foi de aproximadamente 6,5, assim ao serem submetidas a um tampão de pH maior que 6,5, elas assumiram uma carga líquida negativa.

As amostras foram dialisadas *overnight*, a 4°C, contra um excesso de tampão A composto por 20 mM de Tris pH 8,5; 30 mM de NaCl; 2 mM de TCEP. Após isso, foram injetadas em uma coluna pré-equilibrada HiTrap Q 5 mL em tampão A, conectadas ao sistema AKTA (GE) programado a 0,8 mL/min e por fim, foram eluídas em tampão B (20 mM de Tris pH 8,5; 1 M de NaCl; 2 mM de TCEP). As frações eluídas foram coletadas para análise em SDS-PAGE 12%. As proteínas de interesse selecionadas pela análise foram concentradas usando filtros concentradores (*MW cut off of* 30 kDa; *cat number* UFC501096– Merck Millipore). A concentração das proteínas foi determinada por mensuração da UV usando coeficientes de extinção molar. As amostras das proteínas foram separadas em alíquotas, congeladas em nitrogênio líquido e acondicionadas a -80°C.

3.3. Ensaio da atividade enzimática *in vitro*

O monitoramento da atividade enzimática das desoxi-hipusina sintases de *L. major* foi realizado indiretamente, mediante detecção da intensidade de fluorescência do NADH gerado através da desidrogenação da espermidina na reação da via catalisada por desoxi-hipusina sintase. A metodologia utilizada foi adaptada de WOLFF; WOLFF; PARK, 2000.

A fluorescência emitida pelo NADH foi mensurada no espectrofluorímetro *Infinite M200 Pro* (Tecan). Um meio reacional composto por 0,2 M de tampão glicina/NaOH pH 9,2; 17 µM de espermidina; 19 µM de NAD⁺; 3,6 µM de DHPS purificada e água deionizada foi agitado por 3 segundos e posteriormente submetido a excitação com luz ultravioleta no comprimento de onda de 355 nm e a emissão foi

detectada em $\lambda = 445$ nm. Esses comprimentos de onda foram previamente padronizados neste laboratório e são típicos do NADH ligado a transferases (WOLFF; WOLFF; PARK, 2000). Os experimentos foram feitos em triplicata utilizando placas pretas de 96 poços.

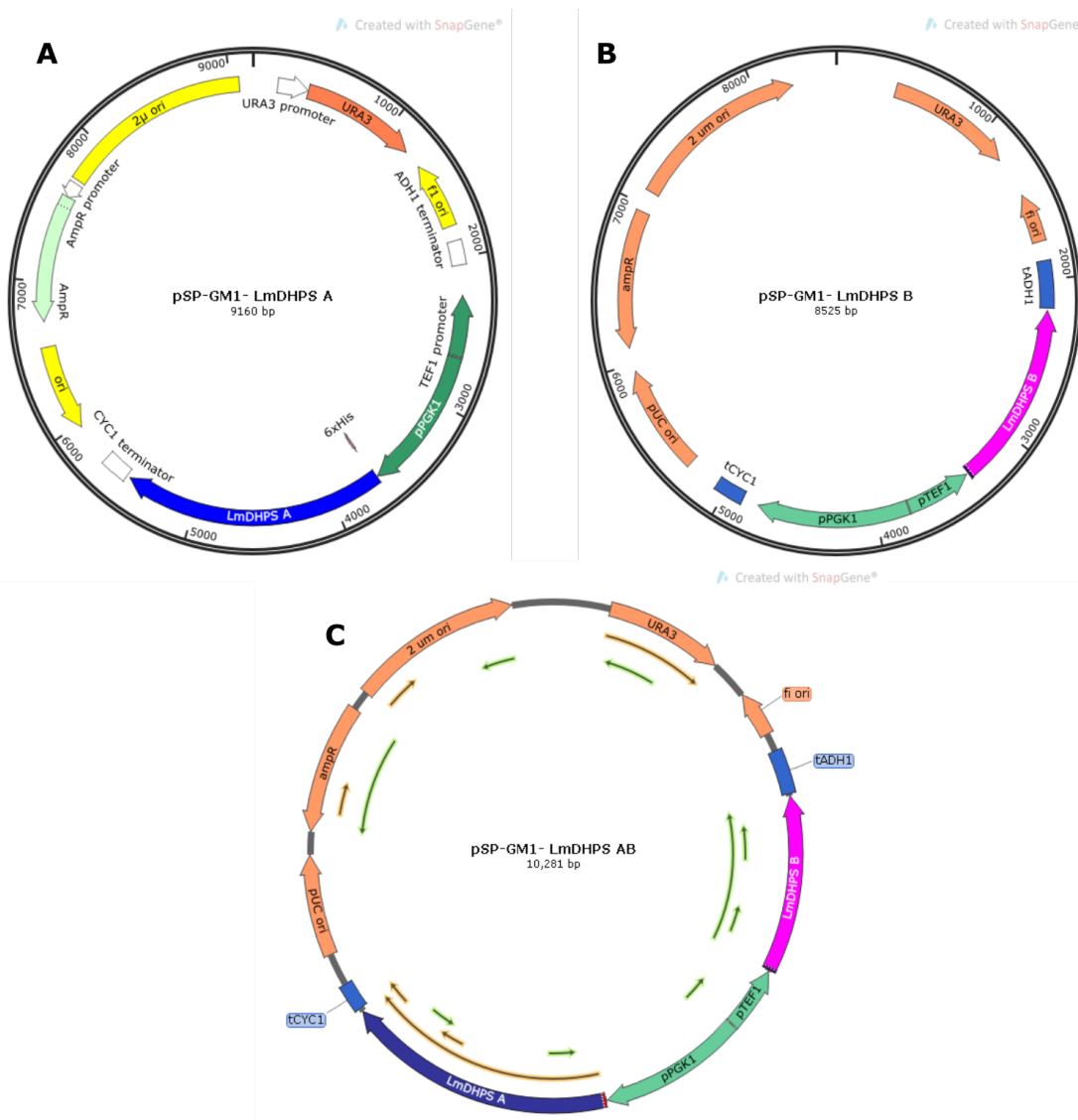
3.4. Verificação de complementação de ScDHPS pelas isoformas de desoxi-hipusina sintase de *L. major*

3.4.1. Clonagem em vetor de expressão em levedura

Para os ensaios da verificação da complementação de *ScDHS* pelas isoformas de *L. major*, primeiramente os genes LmDHPSA e LmDHPSB (*full length*) inseridos no pNIC28-Bsa4 (descrito no tópico 3.1) foram subclonados no vetor de expressão em *S. cerevisiae* pSP-GM1 (Tabela 3) (CHEN et al., 2012). Para isso foram realizadas técnicas de clonagem clássica usando a enzima T4 ligase.

O pSP-GM1 é um vetor amplamente usado para produção de proteína recombinante em *S. cerevisiae*, possui origem de replicação em levedura 2 μ e marca de seleção *URA3* (CHEN et al., 2012). Esse vetor possui dois promotores constitutivos, pTEF1 e pPGK1, o que nos permitiu além de inserir cada gene separadamente, inserir os dois no mesmo vetor, criando as construções pSP-LmDHPSA, pSP-LmDHPSB e pSP-LmDHPSAB (Figura 8).

Figura 8. Ilustração esquemática do vetor de expressão pSP-GM1 com os locais de inserção dos genes LmDHPSA e LmDHPSB. A: Representação da inserção do gene LmDHPSA. **B:** Representação da inserção do gene LmDHPSB. **C:** Representação da inserção dos genes LmDHPSA e LmDHPSB. Elaborado utilizando o software SnapGene Viewer.



Os oligonucleotídeos foram desenhados com a inserção de uma cauda de histidina (6xHis) e os sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI (ThermoFisher) e *Hind*III (ThermoFisher), nos *primers* para amplificação da isoforma A; e *Not*I (ThermoFisher) e *Sac*I (ThermoFisher) nos *primers* para a isoforma B (Tabela 7).

Tabela 7. Sequência dos oligonucleotídeos usados para amplificação das isoformas A e B de DHPS de *L. major*. Em destaque nas sequências estão os sítios de restrição (sublinhado) e a cauda de histidina (negrito).

Gene	Oligonucleotídeo <i>Foward</i> (5'-3')	Oligonucleotídeo <i>Reverse</i> (5'-3')
LmDHPS A	GAGGGATCCATG CATCATCACCATCACC ACATGGCGAATATTGCGGAGTC	GAGAAGCTTTTCATTCTCCACGA CACAGGTGAG
LmDHPS B	TAAGCGGCCGCAATG CATCATCACCATC ACCACATGCTTGCCCTCTGCCCCAG	CTTGAGCTCTTACGCTGCAGCC CCCTCCAG

As isoformas foram amplificadas por PCR, usando DNA plasmidial como molde, através do protocolo descrito no tópico 2.1 desse projeto e, em seguida, purificadas seguindo especificações do *Pure link PCR purification kit* (Invitrogen).

3.4.2. Digestão do vetor de expressão e dos produtos de PCR

Inicialmente, o pSP-GM1 e o produto de PCR da isoforma A de DHPS de *L. major*, foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI-FD (ThermoFischer Scientific) e *Hind*III-FD (ThermoFischer Scientific), usando o *FastDigest Green Buffer* 1 X (ThermoFischer Scientific). A reação foi incubada a 37°C por 60 min, sendo que após os 30 min iniciais, foi acrescentado 1 U/10 µL de CIP (*Alkaline phosphatase, calf intestinal, New England BioLabs*). Em uma segunda etapa, o produto de PCR e os vetores, pSP-GM1 sem inserto e pSP-GM1 com a inserção da isoforma A (pSP-LmDHPSA), foram digeridos com as enzimas de restrição *Not*I-FD (ThermoFischer Scientific) e *Sac*I-FD (ThermoFischer Scientific) por 60 min a 37°C, acrescentando CIP (NEB) nas mesmas condições citadas anteriormente.

3.4.3. Reação de ligação do vetor de expressão aos produtos de PCR

As reações de ligação dos plasmídeos com os produtos de PCR continham 1x de tampão da ligase, uma proporção de 3:1 de inserto em relação ao vetor, 1U/µL de T4 DNA ligase (Invitrogen), em um volume final de 20 µL. As reações foram incubadas a 14°C por 16 h. Metade do volume da reação de ligação foi utilizada para transformação por choque térmico usando as células competentes de *E. coli* DH5α (Tabela 2). As células foram semeadas em meio LB sólido (10 g/L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura 5 g/L; 10 g/L de NaCl; 20 g/L de ágar) contendo 50 µg/mL de ampicilina. A clonagem foi confirmada por diagnóstico de restrição, e por

sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

3.4.4. Transformação de levedura

Os clones confirmados por diagnóstico de restrição foram usados para transformação utilizando a linhagem de *S. cerevisiae* diploide VZL1444 (Tabela 1), seguindo protocolo descrito em REECE-HOYES & WALHOUT, 2018.

A linhagem diploide utilizada apresenta o gene de interesse, *DYS1*, nocauteado com a inserção do gene *HIS3* (*dys1Δ::HIS3*), servindo como uma marca de seleção positiva, uma vez que a linhagem crescerá em meios sem histidina. A linhagem deveria ser diploide devido ao fato do gene *DYS1* ser um gene essencial em *S. cerevisiae*, necessitando de um alelo selvagem. Essa linhagem possui também outros genes que podem ser usados como marca de seleção para o haploide de interesse, possibilitando assim a seleção do haploide em meio altamente seletivo, sem a necessidade da dissecação de tétrades.

A linhagem diploide usada na transformação apresenta, ainda, os genes *CAN1* e *LYP1* nocauteados, os quais servirão como marcas recessivas para a seleção. *CAN1* e *LYP1* codificam, respectivamente, arginina e lisina permeases de membrana plasmática e suas deleções conferem resistência à canavanina e tialisina, respectivamente (BARYSHNIKOVA et al., 2010). Outra característica é o gene repórter *STE2pr-LEU2*, o qual promoverá a expressão do gene *LEU2* apenas em linhagens haploides do *mating type a* em meio de cultura sintético sem leucina (BARYSHNIKOVA et al., 2010). Por fim, esta linhagem também possui um nocaute no gene de resistência pleiotrópica à drogas, *PDR5* (*pdr5Δ::kanMX*).

3.4.5. Esporulação e crescimento seletivo dos haploides de interesse para o ensaio de complementação

Colônias dos diploides obtidas por transformação foram isoladas em meio seletivo SC (1,7 g/L de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos e sulfato de amônio; 2 g/L de um mix sintético de aminoácido; 20 g/L de glicose) contendo 100 µg/mL de nourseotricina (Sigma-Aldrich), 300 µg/mL de G418 (Sigma-Aldrich) e ausência de uracila, para manter as marcas de seleção da linhagem e do plasmídeo inserido. As culturas foram incubadas a 25°C, sob agitação, até o alcance da fase estacionária (aproximadamente 16 h). Um volume de 1 mL das culturas saturadas foi

transferido para um meio com baixa concentração de fontes de carbono e nitrogênio para induzir a formação dos esporos (20 mg/L de acetato de potássio, 40 mg/L de adenina, 20 mg/L de histidina, 20 mg/L de triptofano, 10 mg/L de uracila, 60 mg/L de leucina e 60 mg/L de lisina) e incubados a 25°C, sob agitação, por 7 dias até a formação de ascos visualizados por microscopia. Os esporos foram submetidos a um tratamento de lise para rompimento da parede dos ascos, em que 1000 µL da cultura submetida à esporulação foram centrifugados momentaneamente. Após a remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 100 µL de uma solução contendo 1 M de sorbitol; 1 M de Tris pH 8,0; e 10 ng/mL de zimolase (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C por 20 min. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de água deionizada e esta mistura foi submetida à agitação vigorosa por 5 min. Após agitação, 10 µL foram plaqueados em um meio sólido super-seletivo para os haploides de interesse, composto por SC (1,7 g/L de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos e sulfato de amônio; 2 g/L de um mix sintético de aminoácidos; 20 g/L de glicose) na ausência de arginina, lisina, histidina, leucina e uracila, e contendo os antibióticos 50 µg/mL de canavanina, 50 µg/mL de tialisina e 300 µg/mL de G418 e incubado a 25°C até a obtenção de colônias. A complementação, ou seja, o crescimento das cepas haploide *knock-out* para desoxi-hipusina sintase, em dependência da sequência codificante de DHPS de *L. major* foram visualizadas e escaneadas utilizando o software *BlueScan 9*.

3.4.6. Análise de crescimento comparativo em *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens capazes de suprir a deleção da DHPS de *S. cerevisiae* foram analisadas quanto ao seu crescimento, mediante ensaio de curva de crescimento. Uma cultura de 5 mL foi crescida a 30°C em meio SC (1,7 g/L de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos e sulfato de amônio; 2 g/L de um mix sintético de aminoácidos; 20 g/L de glicose) na ausência de arginina, lisina, histidina, leucina e uracila, e contendo os antibióticos 50 µg/mL de canavanina, 50 µg/mL de tialisina e 300 µg/mL de G418, até aproximadamente 1×10^7 células/mL. Após atingir tal crescimento, as linhagens foram diluídas para uma concentração de partida de aproximadamente 1×10^6 células/mL ($DO_{600nm} = 0,2$). Um volume de 150 µL das células diluídas foi transferido, em triplicata, para

microplacas de 96 poços de fundo chato (SPL – código 004393), contendo ou não, 1mM de GC7 + 1 mM de aminoguanidina (para prevenir a degradação do GC7 por compostos presentes no meio de cultura, como monoamino oxidase). Os valores de absorbância (DO_{600nm}) foram registrados, a cada 15 minutos durante um período total de 14 h, pelo leitor de placas Infinte 200 Pro (TECAN).

Os dados foram normalizados subtraindo o valor da densidade ótica dos meios de cultivo sem cultura celular e os dados foram convertidos à *simple moving average*, usando 4 parâmetros, para suavizar a curva de crescimento gerada. A taxa de crescimento foi calculada utilizando o pacote *growthcurver.R* (SPROUFFSKE; WAGNER, 2016), no software RStudio. Esse pacote permite analisar parâmetros relacionados ao crescimento através da equação logística de crescimento:

$$N(t) = \frac{K}{1 + \left(\frac{K - N_0}{N_0}\right)e^{rt}}$$

Em que N(t) corresponde ao número de células no tempo t; K é o tamanho máximo da população; N₀ é o número de células no tempo 0 e r corresponde à taxa de crescimento intrínseca. A taxa de crescimento intrínseca (r) das linhagens foi utilizada para análise do crescimento comparativo. O script utilizado no RStudio para obtenção dos valores de interesse se encontra no Anexo I. A significância estatística, com 95% de confiança, foi verificada utilizando o teste *t-student*, para n=3. Alguns parâmetros gerados pelo *growthcurver.R* e o *p-value*, obtido pelo teste *t-student*, estão descritos no Anexo II.

3.4.7. Western blot

As linhagens de interesse foram incubadas a 30°C em meio SC (1,7 g/L de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos e sulfato de amônio; 2 g/L de um mix sintético de aminoácidos; 20 g/L de glicose) na ausência de arginina, lisina, histidina, leucina e uracila, e contendo os antibióticos 50 µg/mL de canavanina, 50 µg/mL de tialisina e 300 µg/mL de G418 até aproximadamente 1x10⁷ células/mL. As células foram coletadas por centrifugação e submetidas à lise mecânica. Uma proporção de 1:1 de volume de tampão de lise (200 mM de Tris pH 7,5; 2 mM de EDTA; 2 mM de DTT; 0,2 % de Triton; 2 mM de PMSF; 1x de coquetel inibidor de protease PLAC) por massa de pellet foi utilizado para ressuspender o pellet. As

células foram lisadas por agitação, no homogeneizador de alta velocidade FastPrep-24 (MpBio), mediante adição de contas de vidro para lise, usando 3 ciclos de agitação por 20 segundos, seguidos de 1 minuto no gelo entre os ciclos. O extrato foi clarificado por centrifugação (14000 $\times g$, 15 min, 4°C) e a concentração da proteína total foi determinada utilizando o método Lowry (OLSON, 2016). As amostras proteicas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) e transferidas para membrana de nitrocelulose através de transferência semiseca. A membrana foi bloqueada a temperatura ambiente por 40 min em 10% de leite desnatado diluído em tampão PBST 1X ((PBS 1X (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄ e 2 mM de KH₂PO₄) adicionado de 0.05% de Tween-20)), sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas na presença dos anticorpos primários adequadamente diluídos em PBST 1X, *overnight* a 4°C, sob agitação branda. Os anticorpos utilizados nesse trabalho, bem como sua diluição estão descritos na Tabela 8. As membranas foram lavadas por 5 min, quatro vezes com PBST 1X e incubadas com anticorpo secundário adequado diluído em PBST 1X por 1 h a temperatura ambiente. As membranas, novamente, foram lavadas por 5 min, quatro vezes com PBST 1x e foram tratadas com reagentes quimioluminescentes (ECL-GE Healthcare) e reveladas utilizando o equipamento C-Digit (LI-COR 3600). A quantificação das bandas foi realizada com o software *Image-J* (NIH).

Tabela 8. Anticorpos utilizados nesse trabalho.

Nome	Finalidade	Diluição	Origem
Anti-6xHis - monoclonal de camundongo	Detecção da expressão	1:5.000	Sigma Aldrich
Anti-RPL5 - policlonal de coelho	Normalizador	1:25.000	Coleção do Laboratório (Zanelli et al., 2006)
Anti-hipusina – policlonal de coelho	Quantificação relativa de hipusina	1:2.000	Millipore
Anti-eIF5A total de <i>S. cerevisiae</i> –	Controle	1:10.000	Sigma Aldrich

policlonal de coelho			
Anti-Rabbit IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in goat	Anticorpo secundário	1:20000	Sigma Aldrich
Anti-Mouse IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit	Anticorpo secundário	1:20000	Sigma Aldrich

3.5. Análise molecular entre os sítios de ligação à NAD⁺ e GC7 em *Homo sapiens*, *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*

3.5.1. Geração do modelo molecular por homologia de DHPS de *Leishmania major*

O modelo estrutural tridimensional da desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major* foi gerado utilizando o software online SwissModel (<<https://swissmodel.expasy.org/interactive>>). Para a construção deste modelo levamos em consideração o fato de que essa enzima provavelmente se comporta como um heterocomplexo. Primeiramente, a sequência da isoforma A, no formato FASTA, foi inserida em “*Target Sequence*” e, em seguida, a isoforma B foi adicionada em “*Add Hetero Target*” e o programa iniciou a busca por templates. O modelo homólogo encontrado com maior cobertura e identidade foi selecionado para construção do modelo preditivo de DHPS de *L. major*.

3.5.2. Sobreposição dos sítios de ligação à NAD e GC7

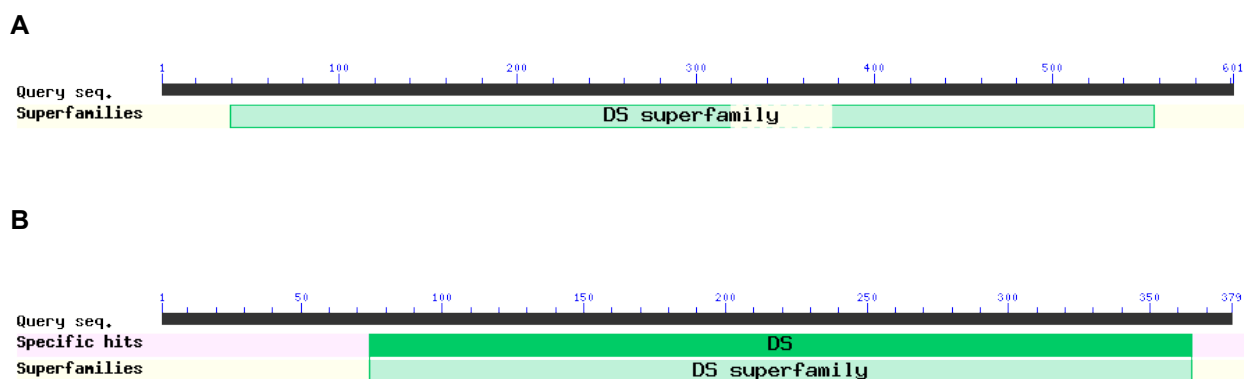
Foi realizada uma sobreposição estrutural entre as estruturas 3D de DHPS de *Homo sapiens* (PDB: 1RQD) (UMLAND et al., 2004), *Trypanosoma brucei* (PDB:6DFT) (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018) e *Leishmania major* (modelo gerado por homologia conforme indicado acima), no software PyMol, através do comando “super proteína1, proteína2”. O valor de RMSD e o número de átomos alinhados nessa sobreposição foi determinado pelo PyMol e está indicado na legenda das respectivas figuras. As sequências foram comparadas tanto no PyMol, quanto em alinhamento global gerado pelo Clustal ômega (<<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Clonagem das isoformas de desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major*

Para desenhar as construções para as enzimas desoxi-hipusina sintase de *L. major*, primeiro identificamos a sequência com maior similaridade para essas proteínas no PDB (*Protein Data Bank*) usando a ferramenta BLASTp. O alinhamento identificou a desoxi-hipusina sintase de *H. sapiens* (ID de entrada do PDB: 1RLZ) (UMLAND et al., 2004) como o homólogo mais próximo dessas proteínas no PDB. Além de mostrar a sequência mais similar, esse alinhamento informou as regiões do domínio DS (*deoxyhypusine synthase*) para cada uma das isoformas (Figura 9). Como visualizado na figura 9, a região de domínio da isoforma B se encontra entre os aminoácidos 74 a 365. A isoforma também apresenta apenas um domínio que vai do aminoácido 39 ao 557, apesar das inserções não conservadas ao longo do domínio (em pontilhado na Figura 1).

Figura 9. Regiões de domínio “Deoxyhypusine synthase” (pfam01916), nas isoformas A (A) e B (B) de *L. major*.



Fonte: Blastp

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LI_NK_LOC=blasthome>).

O alinhamento múltiplo entre as sequências de DHPS de *L. major* e de DHPS de *H. sapiens* (PDB: 1RLZ), usando o software de predição de estrutura secundária *GenThreader* (Figura 10), permitiu visualizar as prováveis regiões que possuem conformações de estruturas secundárias (alfa hélice em rosa e folha- β em amarelo

B

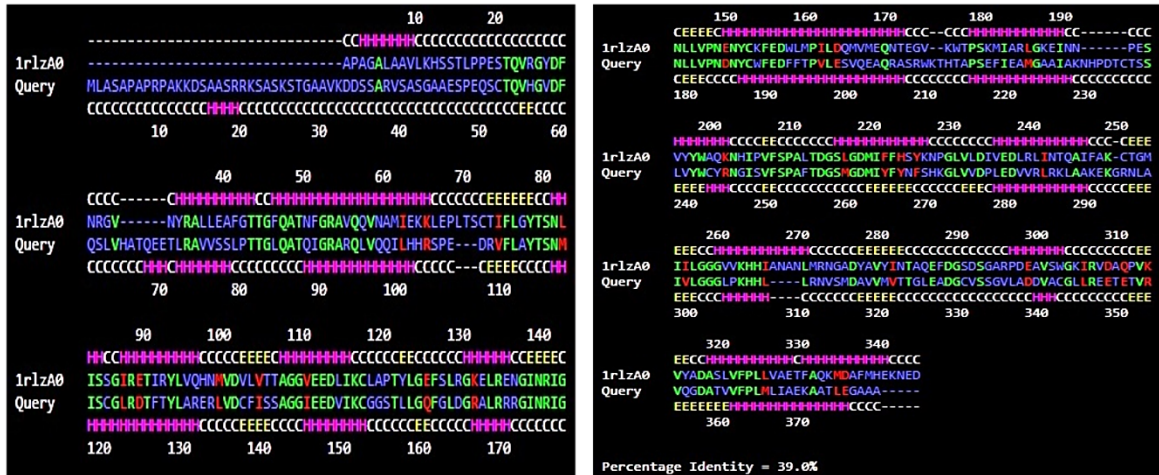


Tabela 9. Combinações de primers e construções geradas para a isoforma A de DHPS de *Leishmania major* (LmDHPSA).

Nome da construção	Primer foward	Primer reverse	Resíduo N-terminal	Resíduo C-terminal	Tamanho do produto de PCR
LmDHPSA-cb001	LmDHPSA – Foward 1	LmDHPSA – Reverse 1	Met 1	Glu 601	1833
LmDHPSA-cb002	LmDHPSA – Foward 1	LmDHPSA – Reverse 4	Met 1	Pro 576	1758
LmDHPSA-cb003	LmDHPSA – Foward 1	LmDHPSA – Reverse 3	Met 1	Ser 582	1776
LmDHPSA-cb004	LmDHPSA – Foward 1	LmDHPSA – Reverse 2	Met 1	Ser 592	1806

Tabela 10. Combinações de primers e construções geradas para a isoforma B de DHPS de *Leishmania major* (LmDHPSB).

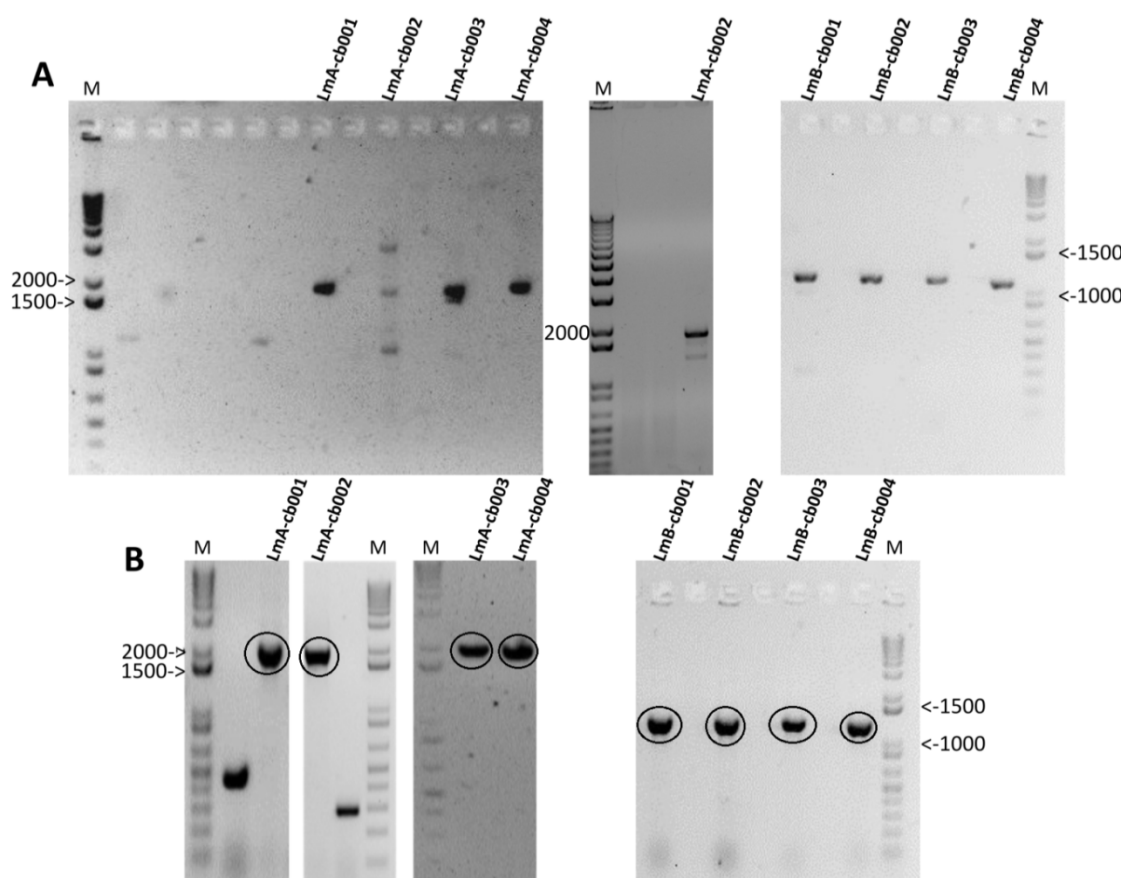
Nome da construção	Primer foward	Primer reverse	Resíduo N-terminal	Resíduo C-terminal	Tamanho do produto de PCR
LmDHPSB-cb001	LmDHPSB – Foward 1	LmDHPSB – Reverse 1	Met 1	Ala 379	1167
LmDHPSB-cb002	LmDHPSB – Foward 2	LmDHPSB – Reverse 1	Pro 10	Ala 379	1143
LmDHPSB-cb003	LmDHPSB – Foward 3	LmDHPSB – Reverse 1	Ser 15	Ala 379	1128
LmDHPSB-cb004	LmDHPSB – Foward 4	LmDHPSB – Reverse 1	Lys 32	Ala 379	1077

Fragmentos amplificados para todas as construções projetadas foram obtidos por PCR (Figura 11 A) e introduzidos no vetor de expressão pNIC28-Bsa4 via clonagem independente de ligação (LIC), com 100% de sucesso nesse processo,

confirmado por PCR de colônia (Figura 11 B) e sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

Figura 11. Clonagem das construções de DHPS no vetor de expressão pNIC28-Bsa4.

A. Fragmentos amplificados por PCR. Tamanho previsto dos fragmentos: LmA-cb001: 1833 pb; LmA-cb002: 1758 pb; LmA-cb003: 1776 pb; LmA-cb004: 1806 pb; LmB-cb001: 1167 pb; LmB-cb002: 1143 pb; LmB-cb003: 1128 pb; LmB-cb004: 1077 pb. (Obs.: O fragmento LmDHPSA-cb002 não foi amplificado na primeira tentativa) **B.** Gel de agarose mostrando PCRs de colônia confirmando alguns clones positivos (circuladas). **M:** 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).



4.2. Purificação das enzimas desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major*

4.2.1. Expressão em pequena escala das enzimas DHPS de *Leishmania major*

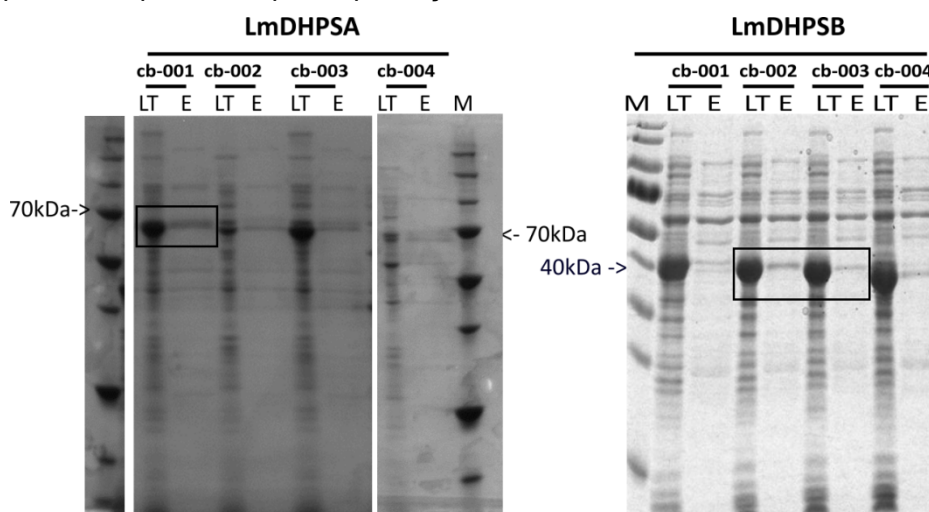
Para encontrar as melhores condições de expressão para a produção das enzimas DHPS de *L. major*, todos os clones positivos foram avaliados por ensaios

de expressão em pequena escala (1 mL), seguido por purificação via IMAC (*Immobilized-metal affinity chromatography*). Este indicou que algumas proteínas podem ser produzidas na forma solúvel (Figura 12).

Para a isoforma A de DHPS de *L. major*, as proteínas foram solúveis quando o meio utilizado no ensaio de expressão continha um excesso de sal e betaína, sendo sua composição final: 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 400mM de NaCl e 5mM de betaína (Sigma Aldrich). Três proteínas foram consideradas solúveis para essa isoforma, LmDHPSA-cb001, LmDHPSA-cb002 e LmDHPSA-cb003. Apesar de todas as proteínas apresentarem baixa intensidade de produção, a proteína LmDHPSA-cb001 obteve maior nível de solubilidade perante as demais (Figura 12). O uso de betaína como estratégia para melhorar a solubilidade da proteína recombinante já foi usado anteriormente com sucesso (LEIBLY et al., 2012; PALEG; STEWART; BRADBEER, 1984; SINGH et al., 2009; LEIBLY et al., 2012).

Para a isoforma B, o ensaio foi conduzido com o meio TB (1,2% de triptona, 2.4% de extrato de levedura, 0,5% de glicerol, 0,17M de KH_2PO_4 e 0,72M de K_2HPO_4), porém as construções só foram obtidas de forma solúvel utilizando a linhagem de *E. coli* BL21, que coexpressa o complexo de chaperona GroES-GroEl (pG-KJE8 – Taraka Bio), induzida por 3 ng/mL de tetraciclina. Esse sistema de expressão foi o mesmo utilizado para produção de DHPS de *H. sapiens*, com sucesso, durante esse projeto (dados não mostrados). Nessas condições, as quatro proteínas da isoforma B de DHPS de *L. major* foram produzidas de forma solúvel, sendo a LmDHPSB-cb002 a que obteve o maior nível de solubilidade (Figura 12). As proteínas LmDHPSB-cb002 e LmDHPSB-cb003 foram produzidas em larga escala.

Figura 12. SDS-PAGE das frações obtidas a partir do teste de expressão em pequena escala. Tamanhos previstos das proteínas: LmDHPSA-cb001: 67 kDa; LmDHPSA-cb002: 64 kDa ; LmDHPSA-cb003: 64,8 kDa; LmDHPSA-cb003: 66 kDa; LmDHPSB-cb001: 43 kDa; LmDHPSB-cb002: 42,6 kDa; LmDHPSB-cb003: 42 kDa; LmDHPSB-cb004: 40 kDa. **M:** marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, 10kDa, ThermoFisher Scientific). **LT:** lisado total. **E:** frações eluídas em 300 mM de imidazol. As proteínas destacadas em retângulo passaram para a etapa de produção em escala aumentada.



4.2.2. Expressão em larga escala das enzimas DHPS de *Leishmania major*

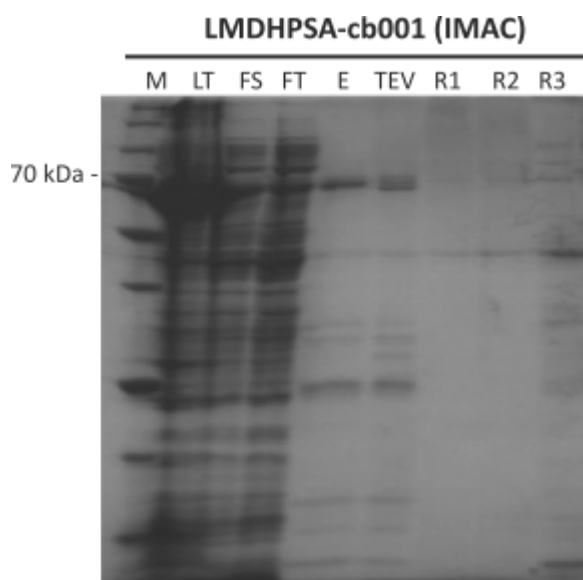
Para confirmar os resultados do teste de produção em pequena escala, foi realizado um aumento de escala da produção de uma proteína da isoforma A, LmDHPSA-cb001 e duas proteínas da isoforma B, LmDHPSB-cb002 e LMDHPSB-cb003, que compreendem a proteína *full-length* da isoforma A e duas formas truncadas da isoforma B. A produção das proteínas foi realizada em 6 L de meio de cultura, utilizando os mesmos meios e linhagens de *E. coli* descritos no ensaio de expressão em pequena escala.

A análise por SDS-PAGE das frações obtidas durante a purificação da proteína LmDHPSA-cb001 (isoforma A) via IMAC (*Imobilized-metal affinity chromatography*), demonstrou que a maior parte da proteína recombinante estava presente na fração insolúvel (Figura 13, fração LT). Assim, não foi obtido rendimento suficiente após o final do processo de purificação. Após a proteína eluída em 300 mM de imidazol ser tratada com TEV protease, não houve mais detecção da proteína nas demais frações, indicando uma possível degradação da proteína

purificada (Figura 13).

Figura 13. Teste de purificação em larga escala da construção LmDHPSA-cb001.

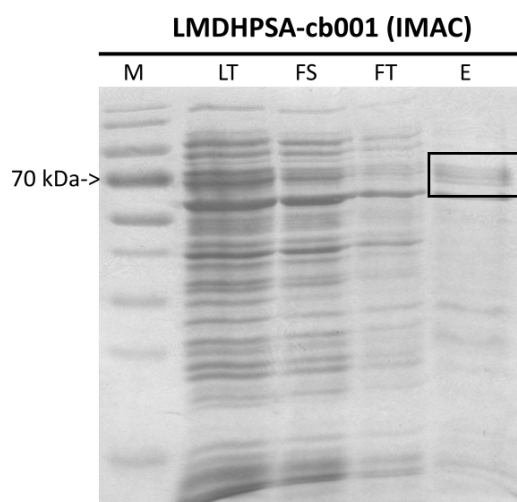
Análise por SDS-PAGE das frações obtidas por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC): lisado total (**LT**), fração solúvel (**FS**), *flow-through* (**FT**), eluato com 300 mM de imidazol (**E**). Análise por SDS-PAGE das frações eluídas após tratamento com TEV protease (**TEV**). Segunda etapa de purificação por IMAC reverso para remoção da cauda histidina, gerando as seguintes frações: *flow-through* (**R1**), lavagem com 30 mM de imidazol (**R2**) e eluição em 300 mM de imidazol (**R3**). Tamanho previsto: 67 kDa. **M**: marcador de peso molecular: *Precision Plus Protein Unstained Protein Standards* (Bio-Rad).



Uma nova purificação da isoforma A foi realizada utilizando a linhagem de *E. coli* que coexpressa GroES-GroEL (Tabela 2) e sem a etapa de remoção da cauda de histidina com TEV protease, na tentativa de obter uma proteína com rendimento suficiente até o final do processo (Figura 14). O rendimento final da produção foi muito baixo, aproximadamente 0,2 mg de proteína purificada por litro de cultura bacteriana, e essa proteína não apresentou atividade enzimática *in vitro* (dados não mostrados). A isoforma A de *L. donovani* apresenta atividade enzimática, ainda que muito baixa em relação à DHPS de humano (CHAWLA et al., 2010). Durante o doutorado, que continuará estes ensaios, será testada a coprodução de LmDHPSA juntamente com a outra enzima LmDHPSB em bactéria na tentativa de melhorar o

rendimento da produção e/ou *folding* da isoforma LmDHPSA.

Figura 14. Segunda tentativa de purificação em larga escala da construção LmDHPSA-cb001. Análise por SDS-PAGE das frações obtidas por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados: lisado total (**LT**), fração solúvel (**FS**), *flow-through* (**FT**), eluato com 300mM de imidazol (**E**). Tamanho previsto: 67 kDa. **M**: marcador de peso molecular: *Precision Plus Protein Unstained Protein Standards* (Bio-Rad).



Para a produção das proteínas truncadas da isoforma B, foi utilizada cromatografia de IMAC como o primeiro passo da purificação (Figura 15 A e Figura 15 D). A análise por SDS-PAGE a 12% das frações da IMAC demonstrou que a maior parte da proteína recombinante estava presente na fração insolúvel. No entanto, esse processo de purificação enriqueceu com sucesso as proteínas provenientes dos lisados celulares clarificados (Figuras 15 A e 15 D).

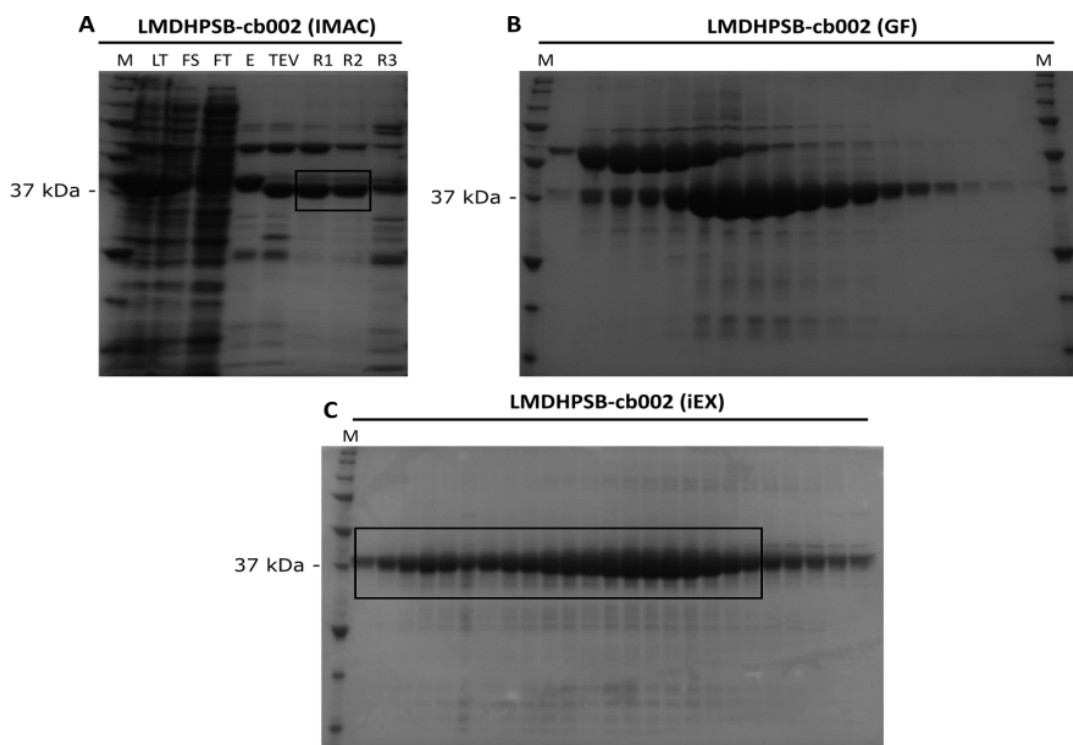
O tratamento com TEV protease removeu eficientemente a cauda de histina da porção N-terminal das duas construções (Figuras 15 A e D, frações TEV). Para remover as proteínas que se ligaram inespecificamente durante a primeira etapa de IMAC e a cauda de histidina, as amostras tratadas com TEV foram submetidas a um segundo passo de cromatografia de afinidade com Ni^{2+} (IMAC reverso). Nesta etapa, a maioria das proteínas se encontraram na fração *flow-through* e na fração de lavagem com 30 mM de imidazol (Figuras 15 A 15 D, frações R1 e R2), enquanto a maioria dos contaminantes, incluindo as DHPs contendo cauda de histidina e TEV foram eluídos da resina com tampão contendo 300 mM de imidazol (Figuras 15 A e D, frações R3). As frações R1 e R2, que continham a maior parte da proteína, foram

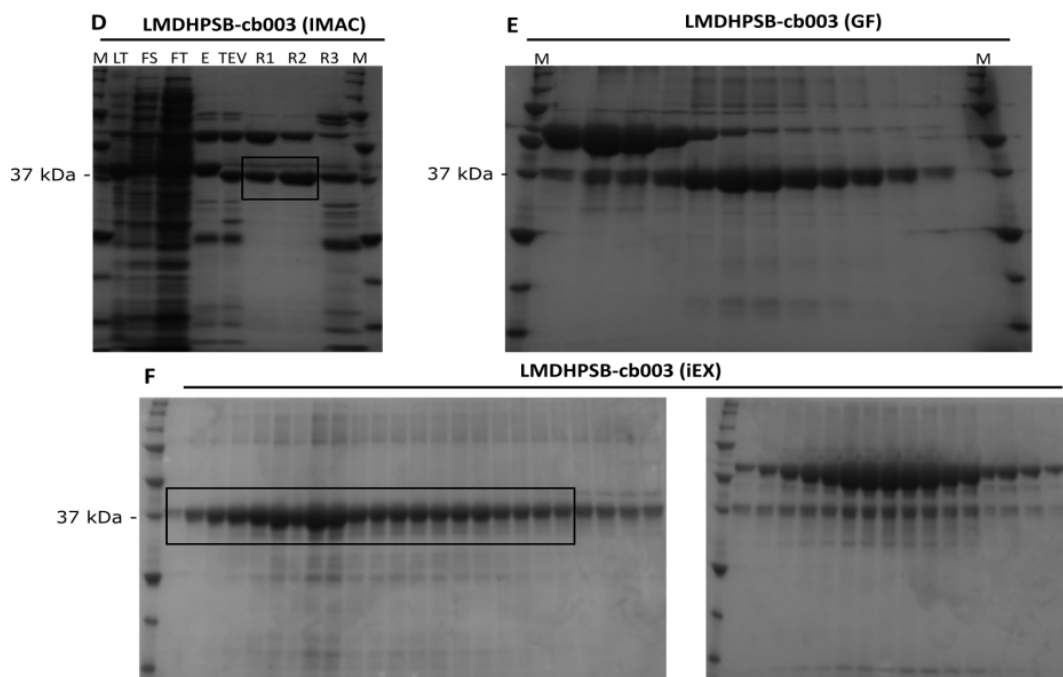
reunidas para a segunda etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular (Figuras 15 B e 15 E).

A produção dessas proteínas utilizando a linhagem de *E. coli* BL21 coexpressando o complexo de chaperonas GroES/GroEL, resultou também na alta expressão de chaperonas, uma vez que foram produzidas proteínas de tamanho coincidente com Hsp60 (RYABOVA et al., 2013). Na tentativa de remover as proteínas contaminantes e obter uma proteína com melhor percentual de purificação, foi necessária a realização de cromatografia de troca iônica (Figuras 15 C e 15 F). Essa cromatografia foi eficaz na remoção dos contaminantes.

O rendimento final da purificação foi de 1,3 mg de LmDHPSB-cb002 purificada por litro de cultura e 0,6 mg de LmDHPSB-cb003 por litro de cultura. As proteínas recombinantes não apresentaram atividade enzimática *in vitro* separadamente ou em conjunto LmDHPSA+LmDHPSB (dados não mostrados). A ausência de atividade enzimática da isoforma B já era esperada e também foi demonstrada na desoxi-hipusina sintase de *L. donovani* (CHAWLA et al., 2010).

Figura 15. Purificação em larga escala das construções LmDHPSB-cb002 e LmDHPSB-cb003. A e D: análise por SDS-PAGE das frações de IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (**FS**), *flow-through* (**FT**), eluato com 300 mM de imidazol (**E**). **Análise por SDS-PAGE das frações eluídas após tratamento com TEV protease (TEV).** Segunda etapa de purificação por IMAC reverso para remoção da cauda de histidina, gerando as seguintes frações: *flow-through* (**R1**), lavagem com 30 mM de imidazol (**R2**) e eluição em 300 mM de imidazol (**R3**). **B e E:** análise por SDS-PAGE das amostras após cromatografia por exclusão molecular. **C e F:** análise por SDS-PAGE das amostras após cromatografia de troca iônica. Tamanho previsto das proteínas (com tag): LmDHPSB-cb002: 42,6 kDa; LmDHPSB-cb003: 42 kDa. Tamanho previsto (sem tag): LmDHPSB-cb002: 40 kDa; LmDHPSB-cb003: 39,6 kDa. **M:** marcador de peso molecular: *Precision Plus Protein Unstained Protein Standards* (Bio-Rad). As proteínas destacadas em retângulos foram selecionadas como a proteína de interesse e as frações que as continha passaram para a próxima etapa de purificação ou foram coletadas para concentração final da proteína.





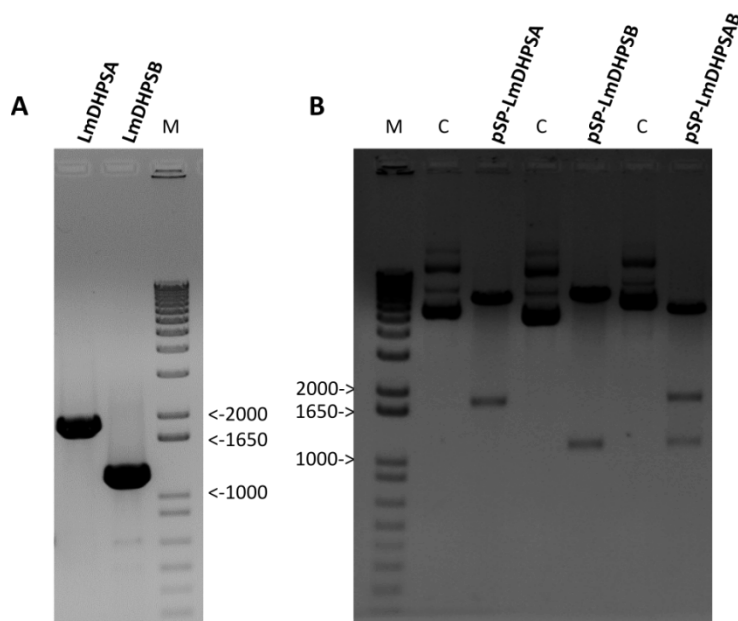
4.3. Verificação de complementação de ScDHPS pelas isoformas de desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major*

4.3.1. Clonagem em vetor de expressão em *Saccharomyces cerevisiae*

As sequências codificantes para as duas isoformas de DHPS de *L. major* foram amplificadas por PCR (Figura 16 A) e introduzidas no vetor de expressão para *S. cerevisiae*, pSP-GM1, via clonagem clássica, os quais foram confirmados por diagnóstico de restrição (Figura 16 B) e sequenciamento de DNA (dados não mostrados). Desta forma, foram gerados clones de pSP-GM1 contendo apenas LmDHPSA ou LmDHPSB (Conforme Figura 8 A e B)(Figura 16 B). Em seguida, um clone de pSP-GM1-LmDHPSA foi utilizado como ponto de partida para se clonar também uma cópia de LmDHPSB, gerando pSP-GM1-LmDHPSAB (Conforme mapa de clonagem da Figura 8 C) (Figura 16B).

Figura 16. Clonagem de construções de DHPS de *L. major* no vetor de expressão pSP-

GM1. A: Fragmentos amplificados por PCR. Tamanho previsto dos fragmentos: LmDHPSA: 1.833 pb; LmDHPSB: 1.167 pb. **B:** Gel de agarose mostrando confirmação dos clones por diagnóstico de restrição. M: 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). **C:** vetores fechados (não submetidos a digestão usando enzima de restrição).



4.3.2. Análise da capacidade de complementação de DHPS de *Saccharomyces cerevisiae* pelas enzimas de *Leishmania major*

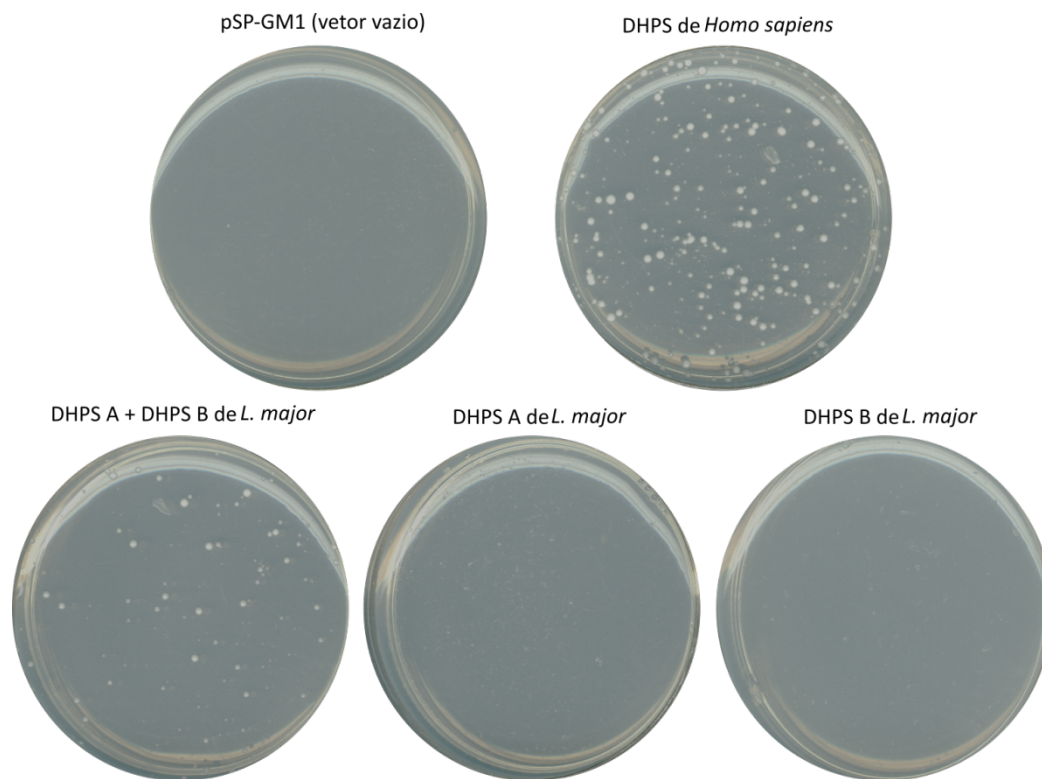
Os plasmídeos contendo as sequências codificantes das isoformas de DHPS de *L. major* foram inseridos, via transformação das células, na linhagem diploide mutante heterozigoto para a deleção do gene que codifica a enzima essencial desoxi-hipusina sintase de *S. cerevisiae*, *DYS1*. Após indução da esporulação, os haploides de interesse selecionados continham a deleção de *DYS1* (*dys1Δ::HIS3*) e, tendo em vista a essencialidade desse gene para a viabilidade celular, as linhagens só cresceram quando as sequências codificantes inseridas foram capazes de complementar essa deleção.

O padrão de crescimento seletivo foi comparado com o crescimento da linhagem *knockout* de *dys1* na presença da sequência codificante de *DHPS* de *H. sapiens* (Figura 17), espécie que já possui sua capacidade de complementação comprovada anteriormente (PARK; JOE; KANG, 1998). Nós observamos que o

plasmídeo contendo as sequências codificantes para as isoformas A e B de DHPS de *L. major* clonadas no mesmo vetor (Figura 8 C) foi capaz de complementar a deleção de *DYS1* (Figura 17), uma vez que se observou o crescimento de colônias no meio seletivo para o haploide nocaute. Apesar da baixa similaridade estrutural entre as desoxi-hipusina sintase de *L. major* e *S. cerevisiae*, 35% para a isoforma A e 37% para a isoforma B, o complexo formado entre as DHPS A e B de *L. major* apresentou conservação funcional em relação a desoxi-hipusina sintase de *S. cerevisiae*. A ausência de correlação entre a porcentagem de identidade estrutural e a capacidade de complementação também já foi demonstrada em estudos de BILSLAND ET AL., 2016.

As enzimas DHPS A e B (Figura 17) de *L. major*, separadamente, não foram capazes de suprir a deleção de *dys1*, uma vez que não foi observado crescimento nessas condições. O fato da complementação funcional ter sido obtida apenas na presença conjunta das duas isoformas confirma a hipótese de que essas enzimas realmente atuam como um heterocomplexo. Em *Trypanosoma brucei* são encontrados ortólogos das duas isoformas de DHPS de *L. major*, que também se comportam como um heterocomplexo funcional, possuindo as deficiências de resíduos catalíticos de uma subunidade sendo complementadas pela outra subunidade. A formação desse complexo é importante tanto para atividade quanto para a estabilidade da enzima no parasita (NGUYEN et al., 2013; AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018). *L. donovani* também apresenta ortólogo para as duas isoformas de DHPS de *L. major*. O ortólogo para isoforma A apresenta atividade enzimática, no entanto, essa atividade é muito menor que a atividade de DHPS de *Homo sapiens*. O ortólogo para a isoforma B não apresentou atividade funcional (CHAWLA et al., 2010). Em *T. brucei*, a análise da atividade enzimática *in vitro* das isoformas separadamente, também mostrou que apenas uma das isoformas, *TbDHSc*, apresentava atividade catalítica e essa atividade era 10.000 vezes menor que a da enzima de humano (NGUYEN et al., 2013). Tendo em vista o resultado do ensaio de complementação, em que as enzimas separadamente não supriram a funcionalidade de *dys1*, é provável que a estabilidade das isoformas de DHPS de *L. major* seja maior quando complexadas, do que separadamente.

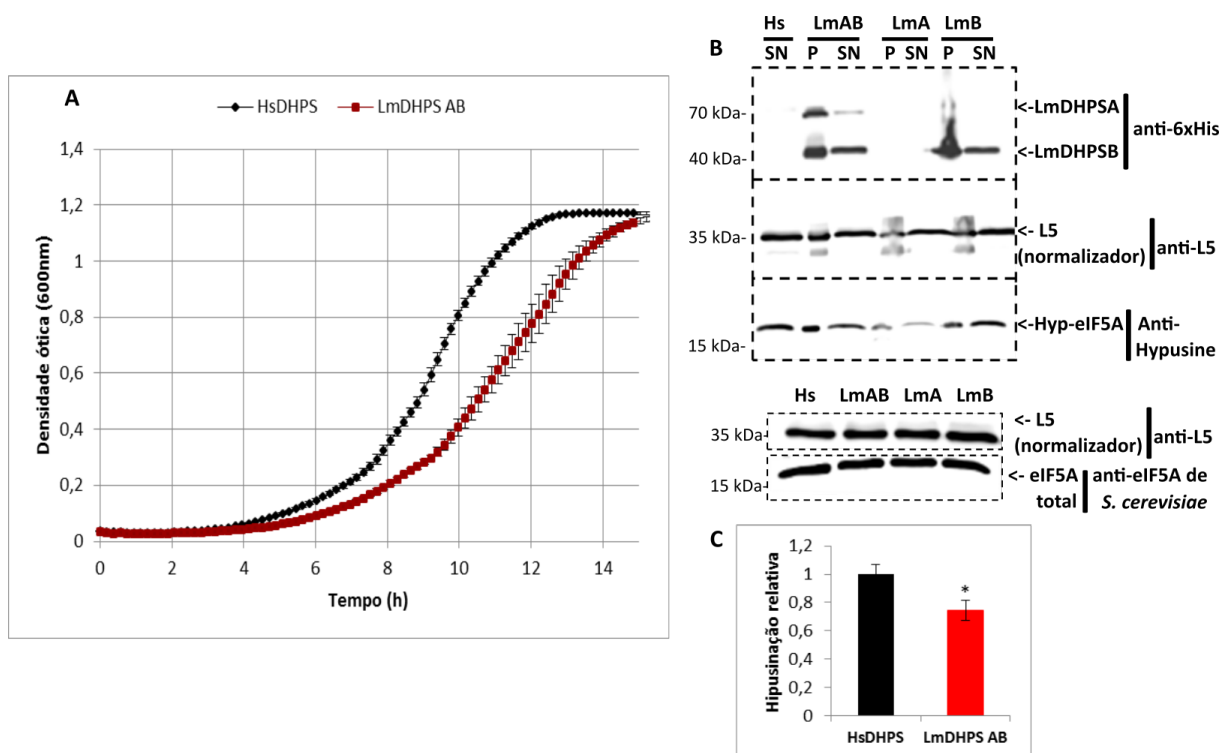
Figura 17. Complementação funcional da deleção de ScDHPS pelas isoformas de DHPS de *Leishmania major*. Meio seletivo SC –arg –lys – his – leu – ura + 50 µg/mL de canavanina + 50 µg/mL de tialisina + 300 µg/mL de G418.



4.3.3. Análise do crescimento diferencial entre as linhagens complementadas em *Saccharomyces cerevisiae*

Ao comparar o crescimento entre as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* complementadas pelas sequências codificantes de DHPS de humano e pelos dois parálogos de *Leishmania major*, observamos que a linhagem complementada por *L. major* apresenta fenótipo de crescimento um pouco mais lento (Figura 18 A). *Homo sapiens* obteve uma taxa de crescimento (r), de acordo com o software RStudio, de $0,831 \pm 0,025$, enquanto a taxa para *L. major* foi de $0,612 \pm 0,065$ ($p < 0,05$), ou seja, a taxa de crescimento da linhagem complementada pela DHPS de *L. major* foi aproximadamente 26% inferior à de humano. (Demais parâmetros obtidos no software RStudio e o p-value, gerado pelo teste *t-student*, se encontram no Anexo II). Além disso, a hipusinação, em *S. cerevisiae*, da DHPS de *L. major* foi aproximadamente 25% inferior ($p < 0,05$) em relação à de DHPS de *Homo sapiens* (Figura 18 B e C).

Figura 18. Crescimento e hipusinação diferencial entre as linhagens de *S. cerevisiae* complementadas pela DHPS de *H. sapiens* e pelas DHPSs de *L. major*. **A:** Crescimento relativo entre linhagens de *S. cerevisiae* expressando a DHPS de humano e as DHPSs de *L. major*. O número inicial de células foi normalizado para 10^6 células/mL e crescidas por 14 h, sob agitação a 30°C. Os valores de DO_{600nm} foram mensurados a cada 15 min e os dados foram convertidos a *simple moving average* (SMA) para suavizar a curva. Os pontos são mostrados como média $\pm$ SEM, n=3. **B:** *Western blot* dos extratos proteicos (80 μ g) das seguintes amostras: linhagem complementada pela DHPS de *H. sapiens* (Hs), linhagem complementada pelas isoformas A e B de *L. major* (LmAB), linhagem diploide (Tabela 1) transformada com a isoforma A de *L. major* (LmA) e linhagem diploide (Tabela 1) transformada com a isoforma B (LmB). Anticorpos policlonais utilizados: anti-RPL5 (normalizador), anti-hypusine e anti-eIF5A. Anticorpo monoclonal utilizado: anti-poli-histidina. **C:** Taxa de hipusinação relativa. A quantificação das bandas foi realizada com o software *image-J* e os níveis proteicos de hipusina foram normalizados pelos níveis de L5 e plotados em unidades relativas à hipusinação da DHPS de *H. sapiens*. Os valores são mostrados como média $\pm$ SEM, n=3. [*] p-value<0,05 para *T-student test*. P: pellet, fração insolúvel. SN: sobrenadante, fração solúvel.

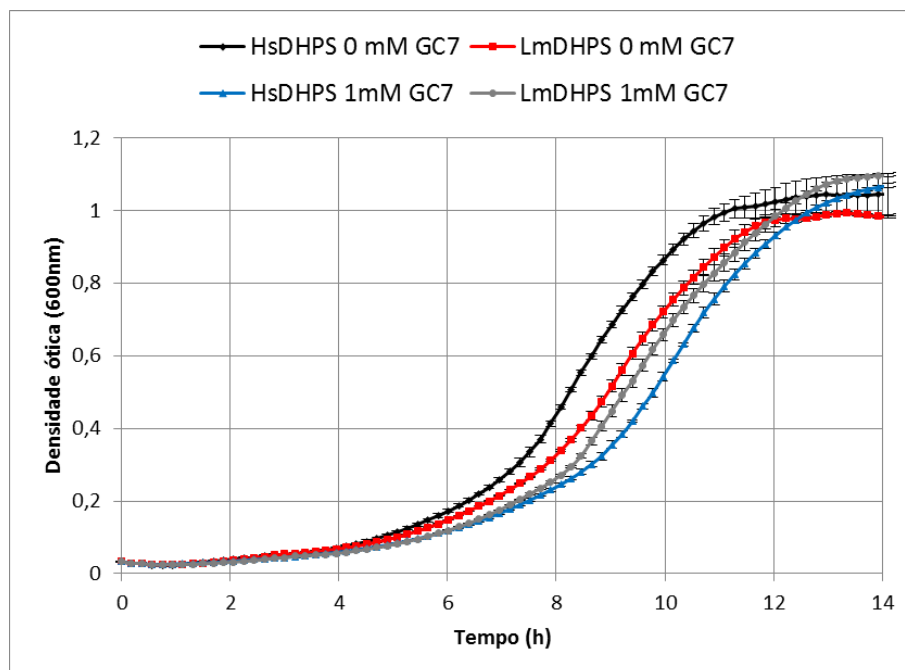


As isoformas LmDHPSA e LmDHPSB foram clonadas com uma cauda de histidina (6xHis) que permite sua detecção por *western blot* (Figura 18 B). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a isoforma A só foi detectada em coexpressão com a isoforma B, ou seja, na linhagem complementada pelas duas isoformas. Na linhagem diploide (Tabela 1) expressando apenas a isoforma A (LmDHPSA), não houve detecção da produção da proteína nas frações insolúveis e solúveis, o que pode indicar que essa proteína, na ausência da isoforma LmDHPSB, seja degradada. Como a construção pSP-GM1-LmDHPSA foi utilizada para gerar a construção pSP-GM1-LmDHPSAB, que gerou a linhagem complementada e nessa linhagem houve a detecção de ambas isoformas, o problema não se deve à construção em si, ou ao processo de clonagem, reforçando a hipótese de que a isoforma A necessita da isoforma B para ser produzida em *S. cerevisiae*. A isoforma B foi produzida tanto na linhagem diploide quanto na complementada (Figura 18 B).

4.3.4. Análise da sensibilidade ao GC7 usando ensaio de crescimento comparativo em *Saccharomyces cerevisiae*

Apesar de ser um dos mais conhecidos inibidores da DHPS (BANDINO et al., 2014; OLIVERIO et al., 2014; ZHOU et al., 2017), GC7 apresentou baixo potencial inibitório na DHPS de *L. major*, utilizando o ensaio em *S. cerevisiae* (Figura19). A linhagem de *S. cerevisiae* complementada pelas isoformas A e B da DHPS de *L. major*, praticamente não foi sensível ao GC7 a uma concentração de 1 mM, concentração esta em que nota-se inibição da taxa de crescimento pela linhagem complementada pela DHPS de humano (Figura19) (Os valores de taxa de crescimento, tempo de geração e capacidade de carga obtidos pela análise destas curvas de crescimento encontram-se no Anexo II).

Figura 19. Efeito do GC7 no crescimento celular entre linhagens de *S. cerevisiae* expressando a DHPS de humano e as DHPSs de *Leishmania major*. O número inicial de células foi normalizado para 10^6 células/mL e crescidas na presença ou ausência de GC7 + aminoguanidina, nas concentrações indicadas na figura, por 14 h, sob agitação a 30°C. Os valores de DO_{600nm} foram mensurados a cada 15 min e os dados foram convertidos a *simple moving average* (SMA) para suavizar a curva. Os pontos são mostrados como média $\pm$ SEM, n=3.



Em *Leishmania donovani*, GC7 também apresentou um baixo efeito inibitório, em ensaio usando apenas a isoforma ativa da DHPS (CHAWLA et al., 2010). Isso é um fato curioso, uma vez que em *Trypanosoma brucei*, GC7 foi capaz de inibir a atividade da DHPS, $IC_{50} = 1,5 \mu M \pm 0,15$ (NGUYEN et al., 2013). O fato de essa enzima possivelmente apresentar diferenças de afinidade a um análogo de substrato, até mesmo com outros tripanossomatídeos, amplia a possibilidade de encontrar moléculas mais específicas para essa espécie.

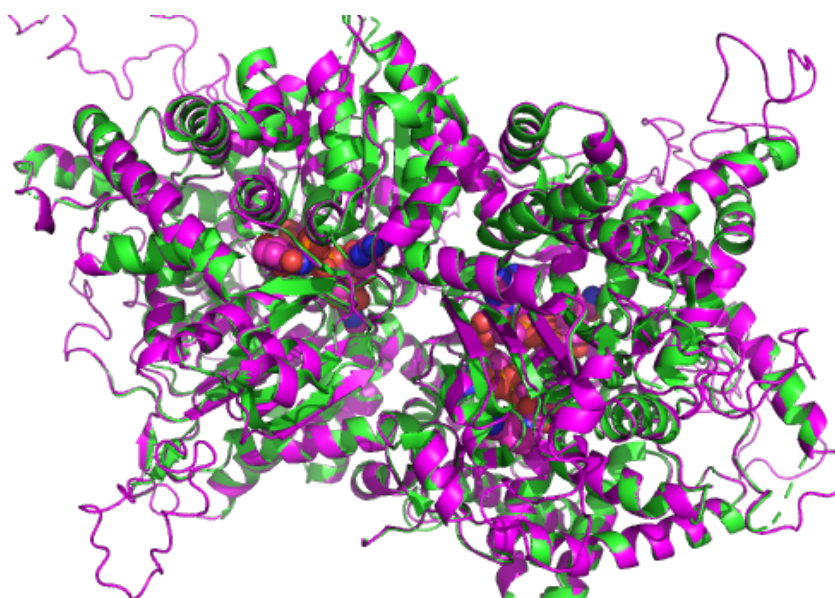
4.4. Comparação entre os sítios de ligação a NAD^+ e GC7 de *Homo sapiens*, *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*

4.4.1. Geração do modelo molecular por homologia de DHPS de *Leishmania major*

Baseado na estrutura cristalográfica da desoxi-hipusina sintase de *T. brucei*

(ID PDB: 6DFT) (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018), o homólogo mais próximo com estrutura depositada, gerou-se um modelo molecular comparativo da desoxi-hipusina sintase de *L. major* (Figura 20). O modelo gerado apresentou 51% de identidade em relação à estrutura 6DFT, alta cobertura e um valor de QSQE (estimativa da qualidade da estrutura quaternária) de 0,82, o que indica uma boa acurácia do modelo predito gerado. Esse modelo constitui um tetrâmero formado por dois heterodímeros, cada um contendo uma subunidade da isoforma A e uma da isoforma B. Por possuir várias extensões em sua sequência, em relação à enzima de humano e de *T. brucei*, a configuração 3D apresenta conformações indefinidas (representadas por *loops*), porém isso não atrapalhará as análises iniciais, devido à alta sobreposição nos sítios de ligação a NAD e GC7.

Figura 20. Modelo molecular comparativo da desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major*. Modelo de tetrâmero de desoxi-hipusina sintase de *L. major* (magenta) em sobreposição com um dos tetrâmeros da estrutura cristalográfica de *T. brucei* (verde) (Adaptado da estrutura do PDB 6DFT, que apresenta 3 tetrâmeros diferentes na unidade assimétrica). O NAD⁺ está representado por esferas vermelhas e azuis. O modelo foi obtido através do SwissModel e a sobreposição foi realizada no software PyMol.

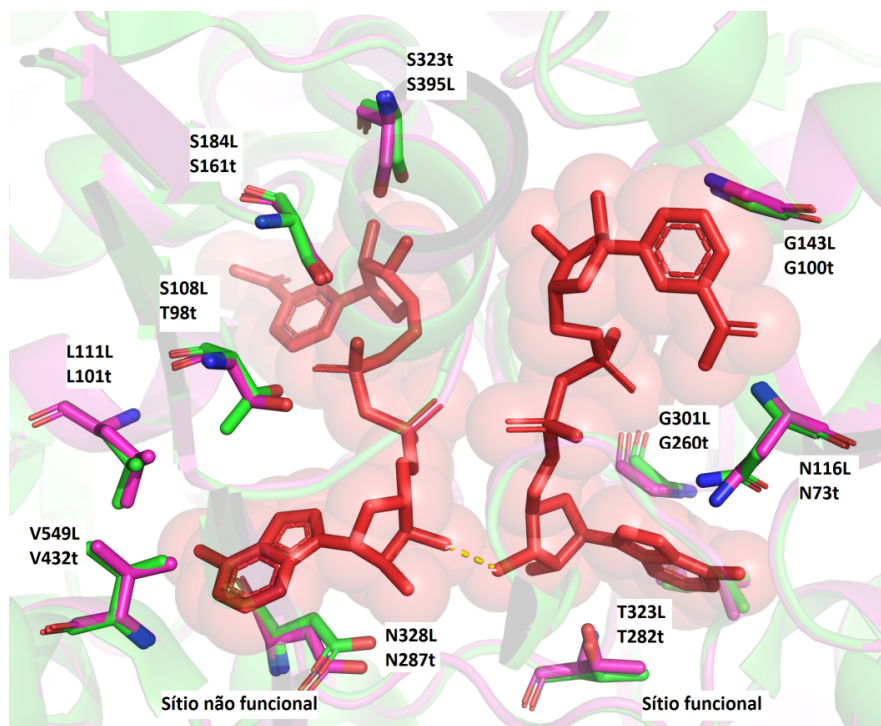


4.4.2. Comparação entre os sítios de ligação a NAD e GC7

A sobreposição entre as configurações tridimensionais das proteínas de *T. brucei* e *L. major* no PyMol, permitiu analisar os aminoácidos dos sítios de ligação à NAD e GC7, uma vez que essas regiões tendem a ser conservadas.

Em *T. brucei*, a interface dos dímeros possui um sítio ativo que compartilha aminoácidos entre um sítio cataliticamente funcional e outro não funcional (não possui a lisina catalítica) (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018) (Figura 21). O modelo proposto concorda com essa configuração, sendo possível que a enzima de *L. major* se comporte da mesma maneira que a de *T. brucei*. No modelo de *L. major* gerado por homologia, as cadeias A e C teriam sítios cataliticamente não funcionais em sua interface e as cadeias B e D teriam sítios funcionais.

Figura 21. Representação da interface dos dímeros contendo um sítio de ligação a NAD cataliticamente ativo e outro não funcional. t: *T. brucei* (verde). L: *L. major* (magenta). As moléculas de NAD provenientes da estrutura de *T. brucei* estão no centro da figura em vermelho. As proteínas de *T. brucei* (6DFT) e *L. major* (modelo por homologia gerado no *SwissModel*) foram sobrepostas no PyMol com 2044 átomos alinhados a um RMSD= 0,924 Å.



Os sítios funcionais das enzimas de *L. major* e *T. brucei* apresentam alta

conservação nos locais de ligação ao NAD e GC7, em relação à enzima de *H. sapiens* (Tabelas 11 e 12), ao contrário do sítio não funcional. O sítio inativo (não funcional) carece de resíduos essenciais para a atividade enzimática, no entanto é capaz de se ligar ao NAD e sua presença parece ser requerida na enzima para orientar e estabilizar a ligação de outro NAD⁺ ao sítio ativo. Mutações sítio dirigidas em alguns resíduos do sítio inativo mostraram que não houve interferência na atividade enzimática, mas sim em sua estabilidade (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018).

O sítio ativo de ligação ao NAD é composto majoritariamente por aminoácidos da isoforma B de *L. major* ou por resíduos de *TbDHSp*, sendo esses os que apresentam maior conservação com a enzima de *H. sapiens* (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação entre os resíduos dos sítios de ligação à NAD entre *Homo sapiens*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*. c: aminoácidos pertencentes às enzimas catalíticas (LmDHPSA e TbDHSc). **p:** aminoácidos pertencentes às enzimas não catalíticas (LmDHPSB e TbDHSp).

<i>Homo sapiens</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>		<i>Leishmania major</i>	
	Sítio funcional	Sítio não funcional	Sítio funcional	Sítio não funcional
F54	F49c	L40p	F48c	L84p
T104	T71p	T98c	T114p	S108c
S105	S72p	A99c	S115p	A109c
N106	N73p	N100c	N116p	N110c
L107	L74p	L101c	M117p	L111c
S109	S76p	G103c	S119p	G113c
T131	T98p	S161c	S141p	S184c
A132	A99p	G162c	A142p	G185c
G133	G100p	G163c	G143p	G186c
E136	E103p	E166c	E146p	E189c
E137	E104p	H167c	E147p	H190c
A235	A210p	S323c	A253p	S395c
D238	D213p	D326c	D256p	D398c
G239	G214p	G327c	G257p	G399c

S240	S215p	D328c	S258p	D400c
G282	G260p	G371c	G301p	G488c
G283	A261p	G372c	G302p	G489c
G284	G373c	G262p	G490c	G303p
V285	V374c	L263p	V491c	L304p
H288	H377c	H266p	H494c	H307p
I306	V280p	L395c	V321p	L512c
N307	T281p	N396c	T322p	N513c
T308	T282p	N397c	T323p	N514c
A309	G283p	A398c	G324p	G515c
D313	D402c	D287p	D519c	D328p
S315	S404c	C289p	S521c	C330p
D316	D405c	E290p	D522c	V331p
S317	S291p	A406c	S332p	A523c
A341	G315p	S430c	G356p	G547c
D342	D316p	E431c	D357p	E548c
A343	A317p	V432c	A358p	V549c

As funções de alguns resíduos não conservados entre *T.brucei* e *L. major*, (em negrito na Tabela 11) serão investigadas futuramente por ensaios de mutagênese sítio-dirigida.

Como demonstrado na Figura 22, a composição dos resíduos de ligação ao NAD na interface do sítio cataliticamente funcional se mantém conservada entre as DHPS de *H.sapiens*, *T. brucei* e *L. major*. Já no sítio cataliticamente não funcional, a composição das DHPS de *T. brucei* e *L. major* é muito alterada em relação a DHPS de *H. sapiens* (Figura 23). Apesar da composição alterada, os aminoácidos são similares ao da enzima de humano, com exceção do V331p de *L. major* e do S430c de *T. brucei*.

Figura 22. Resíduos de ligação a NAD no sítio funcional. h: *H. sapiens* (azul). t: *T. brucei* (verde). L: *L. major* (magenta). A molécula de NAD de *T. brucei* sobreposta ao NAD de *H. sapiens* se encontra na cor cinza. As proteínas de *H. sapiens* (1RQD), *T. brucei* (6DFT) e *L. major* (modelo por homologia gerado no *SwissModel*) foram sobrepostas no PyMol com 2744 átomos alinhados a um RMSD= 0,914 Å.

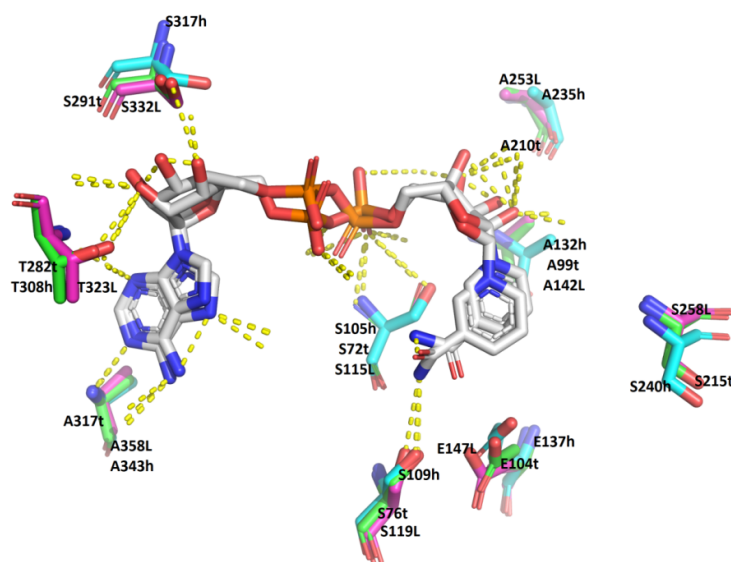
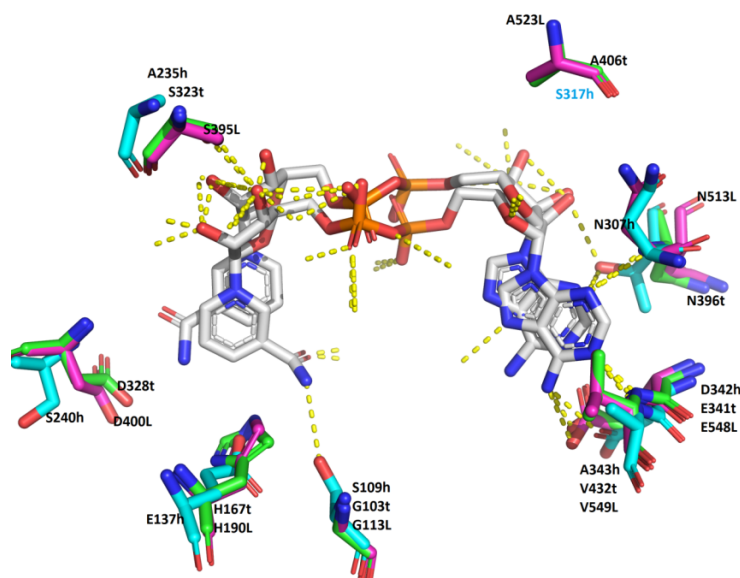


Figura 23. Resíduos de ligação a NAD no sítio cataliticamente não funcional. h: *H. sapiens* (azul). t: *T. brucei* (verde). L: *L. major* (magenta). A molécula de NAD de *T. brucei* sobreposta ao NAD de *H. sapiens* se encontra na cor cinza. As proteínas de *H. sapiens* (1RQD), *T. brucei* (6DFT) e *L. major* (modelo por homologia gerado no *SwissModel*) foram sobrepostas no PyMol com 2744 átomos alinhados a um RMSD= 0,914 Å.



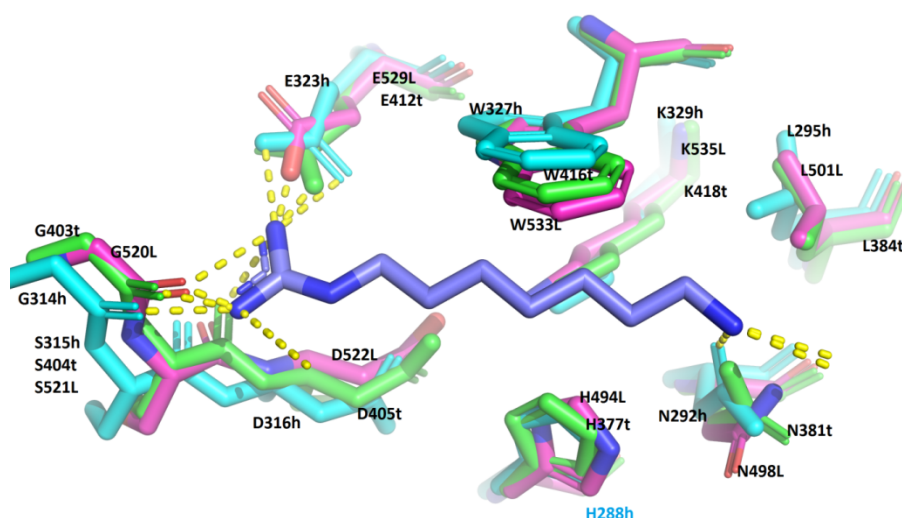
No sítio de ligação ao GC7, os aminoácidos tendem a ser mais conservados com a enzima de humano nas isoformas catalíticas de *L. major* e *T. brucei*, LmDHPSA e TbDHSc (Tabela 12). As funções dos aminoácidos não conservados entre a DHPS de *L. major* e a DHPS de *T. brucei* serão investigadas futuramente.

Tabela 12. Comparação entre os resíduos dos sítios de ligação à GC7 à 6Å de distância entre Homo sapiens, Trypanosoma brucei e Leishmania major. c: aminoácidos pertencentes às enzimas catalíticas (LmDHPSA e TbDHSc). **p:** aminoácidos pertencentes às enzimas não catalíticas (LmDHPSB e TbDHSp) Os aminoácidos não conservados, na mesma posição no modelo, entre *L. major* e *T. brucei* estão destacados em negrito.

<i>Homo sapiens</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>		<i>Leishmania major</i>	
	Sítio funcional	Sítio não funcional	Sítio funcional	Sítio não funcional
N106	N73p	N100c	N116p	N110c
R165	R132p	H207c	R175p	R248c
I166	V133p	F208c	I176p	F249c
G167	G134p	G209c	G177p	G250c
V171	V138p	Y213c	V181p	Y254c
S240	S215p	D328c	S258p	D400c
D243	D218p	E331c	D261p	S403c
H288	H377c	H266p	H494c	H307p
N292	N381c	R270p	N498c	R311p
L295	L384c	-	L501c	-
G314	G403c	G288p	G520c	G329p
S315	S404c	C289p	S521c	C330p
D316	D405c	E290p	D522c	V331p
E323	E412c	A297p	E529c	D340p
W327	W416c	N301p	W533c	C344p
K329	K418c	L303p	K535c	L346p

A composição do sítio cataliticamente funcional proposto para *T. brucei* e nesse modelo preditivo de *L. major* manteve a conservação com o sítio de humano, apresentando os resíduos necessários para a ligação ao GC7. De acordo com o modelo representado pelo *PyMol*, é proposto que ocorram ligações de hidrogênio entre o grupo guanil de GC7 e E529, G520 e S521 em *L. major*. Além disso, os resíduos K535 e W533 estão corretamente posicionados em direção ao GC7 (Figura 24).

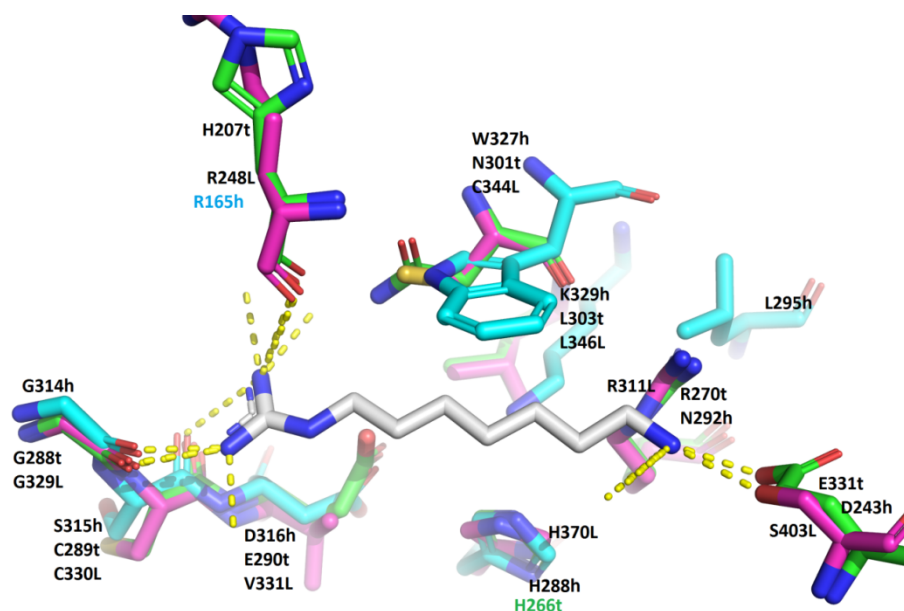
Figura 24. Resíduos de ligação à GC7 no sítio cataliticamente funcional. h: *H. sapiens* (azul). t: *T. brucei* (verde). L: *L. major* (magenta). A molécula de GC7 proveniente da estrutura 1RQD se encontra em azul escuro. As proteínas de *H. sapiens* (1RQD), *T. brucei* (6DFT) e *L. major* (modelo por homologia gerado no *SwissModel*) foram sobrepostas no PyMol com 2744 átomos alinhados a um RMSD= 0,914 Å.



Fonte: PyMol.

O sítio não funcional apresenta uma significativa alteração na composição de aminoácidos, restringindo o tamanho do sítio e, consequentemente, dos compostos capazes de interagirem com ele, sendo assim incapaz de catalisar a formação do intermediário enzima-substrato. Algumas dessas alterações, em *L. major*, foram: substituição da lisina essencial para ligação à espermidina por uma leucina (L346) e a substituição de uma asparagina por uma arginina (R311), adicionando uma carga positiva próximo ao grupo amino de GC7 e impedindo a ligação iônica (Figura 25).

Figura 25. Resíduos de ligação a GC7 no sítio catalicamente não funcional. h: *H. sapiens* (azul). t: *T. brucei* (verde). L: *L. major* (magenta). A molécula de GC7 proveniente da estrutura 1RQD se encontra em cinza. As proteínas de *H. sapiens* (1RQD), *T. brucei* (6DFT) e *L. major* (modelo por homologia gerado no *SwissModel*) foram sobrepostas no PyMol com 2744 átomos alinhados a um RMSD= 0,914 Å.



Fonte: PyMol.

Essas análises moleculares deixaram alguns questionamentos que serão abordados futuramente com estudos de mutagênese sítio-dirigida, seguidos de ensaio de complementação em *S. cerevisiae*, ensaio enzimático e ensaios sobre a estabilidade da proteína. Futuramente, serão investigadas as funções das inserções na sequência da isoforma A e dos resíduos não conservados entre *T. brucei* e *L. major*. Também serão analisadas as funções dos aminoácidos no sítio ativo e suas potenciais contribuições na atividade e estabilidade da enzima. Essas investigações podem auxiliar no entendimento da ausência de sensibilidade do GC7 e na busca de novos compostos com potencial interação a DHPS de *L. major*.

5. CONCLUSÃO

Foi realizada a clonagem de várias versões das isoformas LmDHPSA e LmDHPSB para produção em *E. coli*. No entanto, apesar de ter sido possível sua produção e purificação, não foi observada atividade enzimática *in vitro*. Além disso, houve bastante dificuldade para produção e purificação de LmDHPSA em *E. coli*. Estes resultados sugerem que LmDHPSA, ou ambas isoformas, não foi/foram produzida(s) com sua conformação correta em *E. coli*.

LmDHPSA e LmDHPSB também foram clonadas em vetor de expressão de *Saccharomyces cerevisiae* e, posteriormente, tentou gerar-se uma linhagem haplóide expressando uma de cada ou ambas isoformas como única fonte de DHPS na célula para ensaio de complementação. A capacidade de complementação funcional foi obtida apenas na presença conjunta das duas isoformas, confirmando a hipótese de que essas enzimas atuem como um heterocomplexo, como a DHPS de *Trypanosoma brucei*.

A linhagem de *S. cerevisiae* expressando as enzimas DHPS de *L. major* apresentou taxa de crescimento e hipusinação, aproximadamente, 25% inferior à linhagem expressando a DHPS de humano.

O potente inibidor da DHPS descrito na literatura, GC7, não mostrou capacidade inibitória significativa na linhagem de *S. cerevisiae* expressando as enzimas DHPS de *L. major*.

Um modelo estrutural gerado por homologia prediz que a enzima DHPS de *L. major* seja um tetrâmero, formado por um sítio ativo compartilhado, contendo um sítio cataliticamente funcional e outro não funcional (não possui o resíduo catalítico). O sítio funcional apresenta alta conservação nos locais de ligação a NAD e GC7, em relação à enzima de humano e *T. brucei*, ao contrário do sítio não funcional. O sítio funcional de ligação a NAD seria composto majoritariamente por aminoácidos de LmDHPSB, enquanto que o sítio funcional de ligação a GC7, pela LmDHPSA.

As análises moleculares deixaram alguns questionamentos que serão abordados futuramente. Serão investigadas as funções das inserções na sequência da isoforma A e dos resíduos não conservados entre *T. brucei* e *L. major*. Também serão analisadas as funções dos aminoácidos no sítio ativo e suas potenciais contribuições na atividade e estabilidade da enzima. Essas investigações podem

auxiliar no entendimento da ausência de sensibilidade do GC7 e na busca de novos compostos com potencial interação a DHPS de *L. major*.

6. 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, p. 1–14, 2018.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Current Protocol in Molecular biology**. 2012.
- BANDINO, A. et al. Deoxyhypusine synthase (DHPS) inhibitor GC7 induces p21 / Rb-mediated inhibition of tumor cell growth and DHPS expression correlates with poor prognosis in neuroblastoma patients. **Cell Oncol**, v. 37, p. 387–398, 2014.
- BARYSHNIKOVA, A. et al. **Synthetic Genetic Array (SGA) Analysis in Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 470p. 145–179
- 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. 1–15, 2016.
- BILSLAND, E. et al. Plasmodium dihydrofolate reductase is a second enzyme target for the antimalarial action of triclosan. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–8, 2018.
- CHAWLA, B. et al. Identification and Characterization of a Novel Deoxyhypusine Synthase in Leishmania donovani. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 1, p. 453–463, 2010.
- CHAWLA, B. et al. A Unique Modification of the Eukaryotic Initiation Factor 5A Shows the Presence of the Complete Hypusine Pathway in Leishmania donovani. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. 1–12, 2012.
- CHEN, Y. et al. Enhancing the copy number of episomal plasmids in Saccharomyces cerevisiae for improved protein production. **FEMS Yeast Res**, v. 12, p. 598–607, 2012.
- COUÑAGO, R. M. et al. Structural characterization of human Vaccinia-Related Kinases (VRK) bound to small-molecule inhibitors identifies different P-loop conformations. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–12, 2017.
- DE ALMEIDA JR, O. P. et al. Hypusine Modification of the Ribosome-binding Protein eIF5A , a Target for New Anti-Inflammatory Drugs : Understanding the Action of the Inhibitor GC7 on a Mur- ine Macrophage Cell Line. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, p. 284–292, 2014.
- DEVER, T. E.; DINMAN, J. D.; GREEN, R. Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, p. 1–20, 2018.

DEVER, T. E.; GUTIERREZ, E.; SHIN, B. The hypusine-containing translation factor eIF5A. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 49, n. 5, p. 413–425, 2014.

DIAS, C. A. O. et al. Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. **FEBS Journal**, v. 275, n. 8, p. 1874–1888, 2008.

GANOZA, M. C.; KIEL, M. C.; AOKI, H. Evolutionary Conservation of Reactions in Translation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 460–485, 2002.

GREGIO, A. P. B. et al. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 380, n. 4, p. 785–790, 2009.

GUTIERREZ, E. et al. eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs. **Molecular Cell**, v. 51, n. 1, p. 35–45, 2013.

HOQUE, M. et al. Inhibition of HIV-1 gene expression by Ciclopirox and Deferiprone , drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. **BioMed Central**, v. 17, p. 1–17, 2009.

HUTER, P. et al. Structural Basis for Polyproline-Mediated Ribosome Stalling and Rescue by the Translation Elongation factor EF-P. **Molecular Cell**, v. 68, p. 515–527, 2017.

IMAM, S.; MIRMIRA, R. G.; JAUME, J. C. Eukaryotic translation initiation factor 5A inhibition alters physiopathology and immune responses in a “ humanized ” transgenic mouse model of type 1 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol**, v. 65, p. 791–798, 2014.

JAIN, N. K.; ROY, I. Effect of trehalose on protein structure. **Protein Science**, v. 18, p. 24–36, 2009.

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, p. 6200–6207, 2007.

KANG, K. R. et al. Specificity of the Deoxyhypusine Hydroxylase-Eukaryotic Translation Initiation Factor (eIF5A) Interaction Identification Of Amino Acid Residues Of The Enzyme Required For Binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 11, p. 8300–8308, 2007.

KERSTING, D. et al. A suggested vital function for eIF-5A and dhs genes during murine malaria blood-stage infection. **FEBS Open Bio**, v. 6, p. 860–872, 2016.

KIM, Y. S. et al. Deoxyhypusine Hydroxylase Is an Fe (II) -dependent , Heat-repeat Enzyme Identification Of Amino Acid Residues Critical For Fe (II) Binding And

Catalysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 19, p. 13217–13225, 2006.

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, 2010.

LEIBLY, D. J. et al. Stabilizing Additives Added during Cell Lysis Aid in the Solubilization of Recombinant Proteins. **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012.

LIU, J. et al. Translational Regulation of HIV-1 Replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 6, p. 308–321, 2011.

MARTINEZ-ROCHA, A. L. et al. Posttranslational hypusination of the eukaryotic translation initiation factor-5A regulates *Fusarium graminearum* virulence. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–15, 2016.

MATHEWS, M. B.; HERSHEY, J. W. B. The translation factor eIF5A and human cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1849, n. 7, p. 836–844, 2015.

MILLER-FLEMING, L. et al. Remaining Mysteries of Molecular Biology : The Role of Polyamines in the Cell. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 21, p. 3389–3406, 2015.

MITTAL, N. et al. *Cryptosporidium parvum* has an active hypusine biosynthesis pathway. **Mol Biochem Parasitol**, v. 195, n. 1, p. 14–22, 2014.

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, 2016.

NGUYEN, S. et al. Allosteric Activation of Trypanosomatid Deoxyhypusine Synthase by a Catalytically Dead Paralog. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 21, p. 15256–15267, 2013.

NGUYEN, S. et al. Deoxyhypusine Modification of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A) Is Essential for *Trypanosoma brucei* Growth and for Expression of Polyprolyl-containing proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 32, p. 19987–19998, 2015.

NISHIMURA, K. et al. Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development. **Amino Acids**, v. 42, p. 703–710, 2012.

OLIVERIO, S. et al. The spermedine analogue GC7 (N1-guanyl-1,7-diamineoheptane) induces autophagy through a mechanism not involving the hypusination of eIF5A. **Amino Acids**, v. 7, p. 2767–2776, 2014.

OLSEN, M. E. et al. Polyamines and Hypusination Are Required for Ebolavirus Gene Expression and Replication. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–10, 2016.

OLSON, B. J. S. C. Assays for Determination of Protein Concentration. **Curr. Protoc. Pharmacol**, v. 73, p. 1–32, 2016.

PALEG, L. G.; STEWART, G. R.; BRADBEER, J. W. Proline and Glycine Betaine Influence Protein Solvation. **Plant Physiol.**, v. 75, p. 974–978, 1984.

PARK, J.-H. et al. Molecular cloning , expression , and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase : A HEAT-repeat-containing metalloenzyme. **PNAS**, v. 103, n. 1, p. 51–56, 2006.

PARK, M. H. et al. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. **Amino Acids**, v. 38, n. 2, p. 491–500, 2010.

PARK, M. H.; JOE, Y. A.; KANG, K. R. Deoxyhypusine Synthase Activity Is Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 3, p. 1677–1683, 1998.

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, 2017.

REECE-HOYES, J. S.; WALHOUT, A. J. M. High-Efficiency Yeast Transformation. **Cold Spring Harb Protoc**, p. 563–569, 2018.

ROBBINS, R. D. et al. Inhibition of Deoxyhypusine Synthase Enhances Islet β Cell Function and Survival in the Setting of Endoplasmic Reticulum Stress and Type 2 Diabetes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 51, p. 39943–39952, 2010.

ROSSI, D. et al. eIF5A and EF-P : two unique translation factors are now traveling the same road. **WIREs RNA**, v. 5, p. 209–222, 2014.

RYABOVA, N. A. et al. Molecular Chaperone GroEL / ES : Unfolding and Refolding Processes. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 13, p. 1405–1414, 2013.

SANTIAGO, DA S. A. et al. Structural Analysis of Inhibitor Binding to CAMKK1 Identifies Features Necessary for Design of Specific Inhibitors. **Scientific Reports**, v. 8, p. 2–11, 2018.

SAVITSKY, P. et al. High-throughput production of human proteins for crystallization : The SGC experience. **Journal of Structural Biology**, v. 172, n. 1, p. 3–13, 2010.

SCHMIDT, C. et al. Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 4, p. 1944–1951, 2016.

SCHRODER, M. et al. Linker-region modified derivatives of the deoxyhypusine synthase inhibitor CNI-1493 suppress HIV-1 replication. **Arch. Pharm**, v. 349, 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, 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, 2017.

SINGH, L. R. et al. Glycine betaine may have opposite effects on protein stability at high and low pH values. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 929–935, 2009.

STOLS, L. et al. A New Vector for High-Throughput , Ligation-Independent Cloning Encoding a Tobacco Etch Virus Protease Cleavage Site. **Protein expression and purification**, v. 25, p. 8–15, 2002.

STRNADEL, J. et al. eIF5A-PEAK1 Signaling Regulates YAP1/TAZ Protein Expression and Pancreatic Cancer Cell Growth. **Cancer Res**, v. 77, n. 8, p. 1997–2007, 2017.

TAYLOR, C. A. et al. Modulation of eIF5A Expression Using SNS01 Nanoparticles Inhibits NF- κ B Activity and Tumor Growth in Murine Models of Multiple Myeloma. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 7, p. 1305–1314, 2009.

TERSEY, S. A. et al. Protective effects of polyamine depletion in mouse models of type 1 diabetes : implications for therapy. **Amino Acids**, v. 46, n. 3, p. 633–642, 2014.

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. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p. 28697–28705, 2004.

VU, V. V et al. Human deoxyhypusine hydroxylase , an enzyme involved in regulating cell growth , activates O₂ with a nonheme diiron center. **PNAS**, v. 106, n. 35, p. 14814–14819, 2009.

WEIR, B. A.; YAFFE, M. P. Mmd1p , a Novel , Conserved Protein Essential for Normal Mitochondrial Morphology and Distribution in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 1656–1665, 2004.

WOLFF, E. C.; WOLFF, J.; PARK, M. H. Deoxyhypusine Synthase Generates and Uses Bound NADH in a Transient Hydride Transfer Mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9170–9177, 2000.

WORIEDH, M. et al. Preventing Fusarium Head Blight of Wheat and Cob Rot of Maize by Inhibition of Fungal Deoxyhypusine Synthase. **MPMI**, v. 24, n. 5, p. 619–627, 2011.

ZANELLI, C. F. et al. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, n. 4, p. 1358–1366, 2006.

ZHOU, Q. et al. GC7 blocks epithelial-mesenchymal transition and reverses hypoxia-induced chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma cells. **Am J Transl Res**, v. 9, n. 5, p. 2608–2617, 2017.

ANEXO I

Script para análise das curvas de crescimento usando o pacote R:

```
## Re-written 2012-11-03 B. D. Ripley

useDynLib(bitops)

export(bitFlip, bitAnd, bitOr, bitXor, bitShiftL, bitShiftR, cksum)

rm(list = ls(all=TRUE))

library(growthcurver)

setwd("C:\\Users\\nome do usuario\\Desktop\\nome da pasta em que está
anexado o arquivo")

dados <- read.csv("nome do arquivo.CSV",header = T,sep = ";", quote = "\"",
dec = ",")

dados$Time <- dados$Time/60/60
curva1<-SummarizeGrowth(dados$Time,dados$dados de interesse)
plot(curva1)
curva1$vals
```

ANEXO II

Output do pacote *growthcurver.R* para as curvas de crescimento analisadas neste trabalho:

k: *carrying capacity parameter*.

t-gen: *fastest possible generation time*.

r: *growth rate*.

Os valores de *k* e *r* foram obtidas com o pacote *growthcurver.r* de acordo com a seguinte equação logística:

$$N(t) = \frac{K}{1 + \left(\frac{K - N_0}{N_0}\right)e^{rt}}$$

N(t) = número de células no tempo *t*; **N₀** = número de células no tempo 0

K = tamanho máximo da população; **r** = taxa de crescimento intrínseca.

O tempo de geração foi calculado da seguinte forma:

$$t_{dt} = \frac{\ln 2}{r}$$

t_{DT} = tempo de geração; **r** = taxa de crescimento.

*P-value de *r* obtido mediante teste estatístico *t-student*, para *n*=3, comparando, na primeira tabela, o crescimento entre uma linhagem complementada por um homólogo e outro e na segunda tabela, comparando as linhagens na condição tratada (GC7 1 mM) e não tratada (GC7 0 mM).

Quadro 1. Valores obtidos para análises da curva de crescimento da Figura 18.

Linhagem	Amostragem	r	Média (r)	p-value (r)*	k	Média (k)	t_gen	Média (t_gen)
HsDHPS	1	0,818	0,8313 ± 0,025	0,0056	1,169	1,167	0,847	0,843
	2	0,816			1,179		0,85	
	3	0,86			1,155		0,806	
LmDHPS AB	1	0,608	0,6123 ± 0,065		1,217	1,233	1,141	1,141
	2	0,549			1,282		1,262	
	3	0,68			1,201		1,019	

Quadro 2. Valores obtidos para análises da curva de crescimento da Figura 19.

Linhagem m	Amostragem	r	Média (r)	p-value (r)*	k	Média (k)	t_gen	Média (t_gen)
HsDHPS GC7 0 mM	1	0,895	0,854 ± 0,068	0,071	0,975	1,043	0,775	0,816
	2	0,891			0,992		0,778	
	3	0,775			1,161		0,895	
HsDHPS 1 mM GC7	1	0,709	0,714 ± 0,004		1,105	1,093	0,978	0,970
	2	0,717			1,077		0,967	
	3	0,717			1,098		0,966	
LmDHPS AB GC7 0 Mm	1	0,884	0,794 ± 0,078	0,395	0,839	0,998	0,784	0,878
	2	0,742			1,101		0,934	
	3	0,755			1,055		0,918	
LmDHPS AB GC7 1 mM	1	0,715	0,745 ± 0,041		1,111	1,112	0,970	0,933
	2	0,728			1,114		0,953	
	3	0,792			1,111		0,875	