

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 30/09/2024.

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

SUELEN FERNANDES SILVA

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

ARARAQUARA - SP

2023

SUELEN FERNANDES SILVA

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

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

Orientador: Prof. Dr. Clelei Fernando Zanelli

Bolsa: Brasil (CAPES) 001

Doutorado Sanduíche: CAPES PRINT

88887.570728/2020-00 Edital nº41/2017

Projeto: CNPq Processo 141241/2019-5

ARARAQUARA - SP

2023

S586e Silva, Suélen Fernandes
Estudo funcional e rastreamento de novos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase de organismos eucariotos patogênicos / Suélen Fernandes Silva. -- Araraquara, 2023
117 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Cleslei Fernando Zanelli

1. Doenças tropicais. 2. Malária. 3. Enzimas. 4. Inibidores enzimáticos. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: SUÉLEN FERNANDES SILVA

ORIENTADOR: CLESLEI FERNANDO ZANELLI

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

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

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

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

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

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

Araraquara, 30 de março de 2023



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

Agradecimentos

Agradeço a Deus.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Resumo

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

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

Abstract

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

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

Lista de Figuras

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

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

Figura 31.	Hipusinação da eIF5A ao reprimir a expressão de DHS com diferentes concentrações de metionina.....	87
Figura 32.	Hipusinação da eIF5A na presença de GC7.....	88
Figura 33.	Hipusinação da eIF5A na presença de inibidores da PvDHS.....	89
Figura 34.	Determinação de IC ₅₀ dos compostos GNF-Pf-744 (A) e CHEMBL1081521 (B).....	91
Figura 35.	Determinação de IC ₅₀ dos compostos GNF-Pf-3738 (A) e TCMDC-124630 (B).....	92
Figura 36.	Reação parcial catalisada pela DHS.....	93
Figura 37.	Determinação do pH ideal para a reação cinética das enzimas DHS de <i>P. vivax</i> (A) e <i>L. major</i> (B).....	94
Figura 38.	Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial de LmDHS e determinação dos parâmetros cinéticos.....	95
Figura 39.	Determinação do IC ₅₀ para o GC7 em LmDHS.....	96
Figura 40.	Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da PvDHS e determinação do IC ₅₀ para o GC7.....	97
Figura 41.	Determinação do tampão ideal para a reação cinética das enzimas DHS de <i>P. vivax</i>	99
Figura 42.	Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da PvDHS em pH 8,8 e determinação do IC ₅₀ para o GC7.....	100
Figura 43.	Teste da inibição de GNF-Pf-744 nas enzimas HsDHS e PvDHS usando o ensaio enzimático empregando a reação parcial.....	101

Lista de Tabelas

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

Lista de Abreviaturas e Siglas

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

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

Sumário

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

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

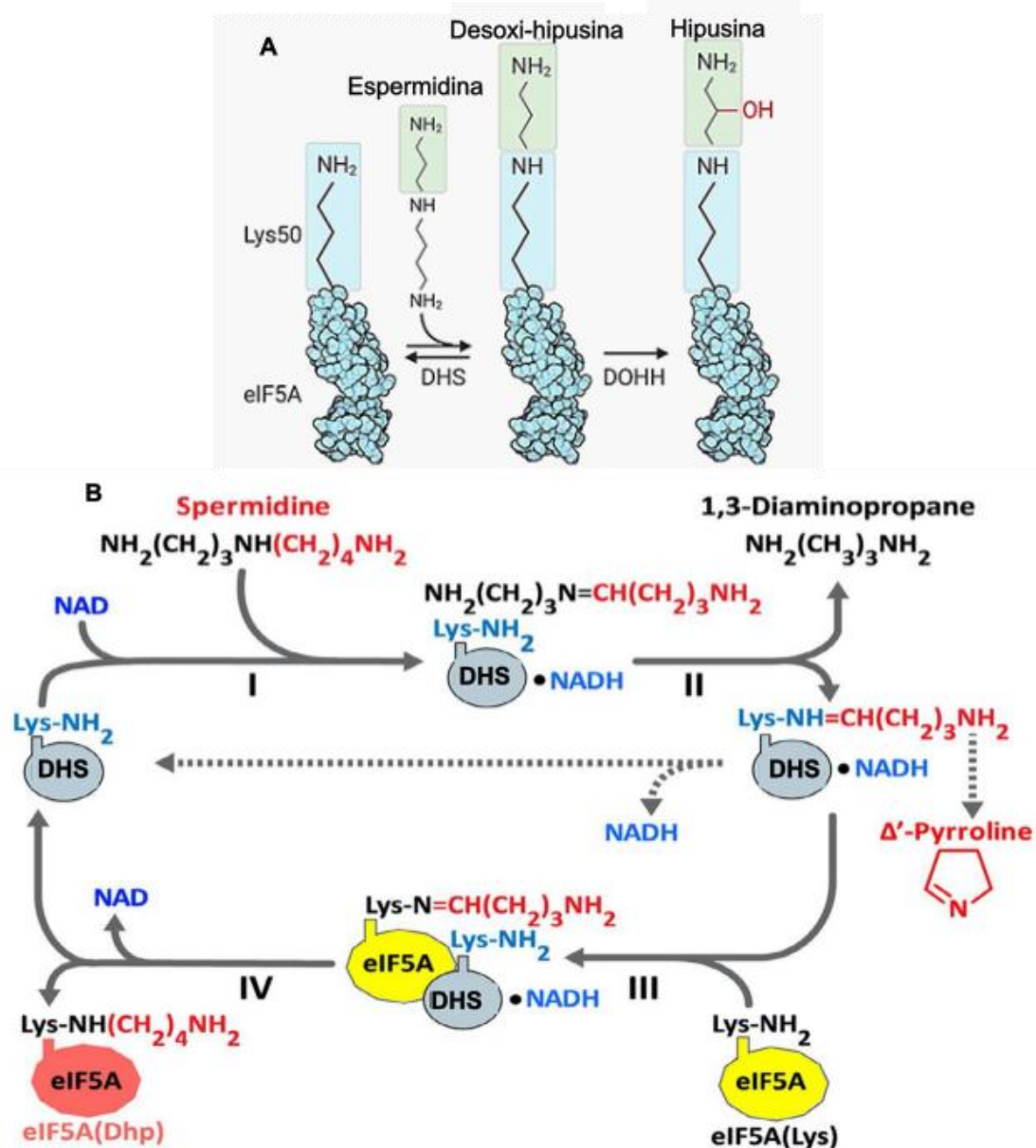


Figura 1. Representação da modificação pós-traducional de eIF5A em humanos, catalisada pelas enzimas desoxi-hipusina sintase (DHS) e desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH). (A) DHS transfere o grupo 4-aminobutil da molécula de espermidina para K50 (lisina 50) de eIF5A. DOHH finaliza a modificação realizando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

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

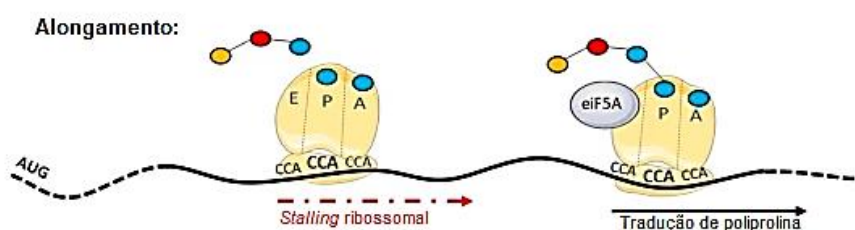


Figura 2. Atuação de eIF5A na etapa de alongação da tradução. Esquerda: *stalling* ribossomal induzido por sequências repetitivas de poliprolina. Direita: eIF5A se liga no sítio E do ribossomo pausado e interage com o peptidil-tRNA situado no sítio P ajudando a promover a formação de ligações peptídicas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

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

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

1.3. Desoxi-hipusina sintase (DHS)

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

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


```

                                1      10      20      30
LmDHSc .....MANIAESAVLVSSASSAQAQAVAKLTQVQGP.TSG
TbDHSc .....MAELAKSAVLVSSCTDDLLGDAKQVVVGNQED
LmDHSp MLAS....APAPRPAKKDSAASRRKSASKSTGAAVKDDSSARVSASGAAE...SPEQSCTQVHGVDQFS
TbDHSp .....MS...GVFPFSRVIGDLDYSN
HsDHS .....MEGSLEREAP.....AGALAAVLKHS...TLPPESTQVRGYDFNR
PvDHS MTNQGAFKEV NKIRSESDDGESSDEKSGI.....EDAKSSVFVKS...KIPENTDVVKGINFEE

                                40      50      60      70      80      90
LmDHSc .....FDKAQHIIIGSYSTMGFQATNYGLARSLAQRMRKQPPSKVYQIKDGKYVLVPPDVGEDGRTLQQ
TbDHSc .....LHSAEAVLNRYSTVGFQASNLARAFSICEMMLTPQSPSPSLMPTEGDQ.....ASESP
LmDHSp LVHATQEETLRVAVSSLPPTTGLQATQIGRARQLVQQILHHS.....
TbDHSp LLNIGQEEAIRCVLNAYPNIGLEATNLGRARRIVQRALNDNGM.....
HsDHS .....GVNYRALLEAFGTTGFQATNFGRAVQVQVNAMEKKLEPLSQD.....EDQH..ADLTQSRR
PvDHS .....EVNLHQFVNQYKYMGFQATNLGIGIDEVNKMIHFKYAEGGEGTQDGHNDHDQD..SDDERQALP

                                100     110     120     130     140     150     160
LmDHSc EHVYPNLFMGVSANLMGTGCREAVRFLVQEGVAHRSPEASAAASADGTDDQLMFARLKREYVETYGGPPH
TbDHSc VMVQPTLFVGVTANLFGTGCREAIRFLCTECVPLPNGVEPATPL...DD.....MAGIS...CDGTGA
LmDHSp ..PEDRVFLAYTSNMISCGLRDTFTYLARER.....
TbDHSp ..DGNKVMLAYTSNLISSGLRDTFACLAREN.....
HsDHS PLTSCTIFLGYTSNLISSGIRETIRYLVQHN.....
PvDHS KKKKCLIWLSFTSNMISSGLREIFVYLAKKK.....

                                170     180     190     200     210     220     230
LmDHSc PDEEVPRAHSFLCAIVVSGGVVEHDLRRACTAYTLHYYASEAQGHVSSTISSEATAPLEGLQRRAETPLG
TbDHSc LKPSCDSRALIHVLVVSGGAMEHDIRRACESYKLSRDGAEEEGEQF.....HHFVE
LmDHSp .....LVDCFISSAGGTEDDVIKCGGSTLLGQFGLDGR.....
TbDHSp .....RIGAVVTTAGGVEDDVIKCLGDTLVGDFALNDH.....
HsDHS .....MVDVLVTTAGGVEDDLKCLAPTYLGEFSLRGK.....
PvDHS .....FIDVVVTTAGGVEDDIKCFSKTYLGDFNLNGK.....

                                240     250     260     270     280
LmDHSc TGAAAGAAKPARFGNVEYPPQSPGSALFDRLMRTFAQRLCARQARLRAAAMA.....
TbDHSc RDRSRSKGTDCHEFGNVRYNSSGVASRNLFSCVMRCLKRLAEAORKEKANREA.....
LmDHSp ...ALRRRGINRIGNLLVPNDNY...CWFEDFFPVLESVQEAQRASR.....
TbDHSp ...ALRNNGLNRIGNLLVPNDNY...RNFEDFFPVLLRRLHEQORDSR.....
HsDHS ...ELRENGINRIGNLLVPNENY...CKFEDWLMPILDQMVMEQNTEG.....
PvDHS ...KLRKKGWNRRIGNLLVPNDNY...CKFEDWLQPLLNKMLHEQNRKNEELFLRKLDKRRRGGGGHGERE

                                290     300     310     320     330     340
LmDHSc .....KPIPD...KYDDVCSW..SVTPSEVWALCGLWLVDMLAEALRAVQSCPSHLTSGSGVGT
TbDHSc .....APIPE...AYYDVCSW..AITPSTLWYMAGLWMADIFTEALQETGEVT.....
LmDHSp .....WKTHTAPSEFIEAMG.....AAIA.....
TbDHSp .....WTTKTPSQIIAEIG.....AALE.....
HsDHS .....VKWTPSKMIARLG.....KEIN.....
PvDHS PPSPPHTPHAPSPPSPCDSSDEDESDMFYLSPSEFIDKLG.....EEIN.....

                                350     360     370     380     390     400     410
LmDHSc AESVTANGKGQEADRDAHIATSALYRAEALARARTTVVYWAAVQVSLFSPSFVDGDITSYLLPTVPVAA
TbDHSc .....DEKVASEEGLKRAKSTVLYWAAARNGVPIFSPSSLTDGDIMEFILTAGD...
LmDHSp .....KNHPDTCTSSLVYWCYRNGISVFSPAFTDGSMGDMIFYFYNFS..
TbDHSp .....SVRPNDCGSSLIYWCYRNDIPVFSPAFTDGSMGDMIFYFYNYS..
HsDHS .....N.....PESVYWYWAQKNHIPVFSPALTDGSLGDMIFFHSYK..
PvDHS .....D.....ESSLIYWYCHKNDIPVFCPGLTDGSLGDMNLFFHNYG..

```

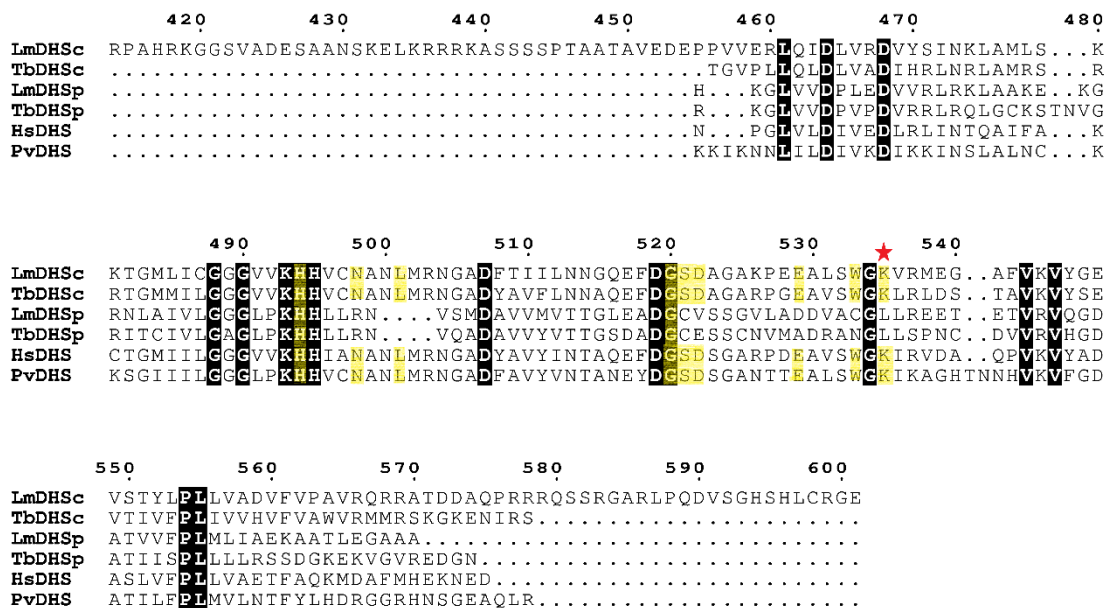


Figura 3. Alinhamento global das proteínas DHS de *Homo sapiens*, *Plasmodium vivax*, *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*. Destacados com fundo preto e letras brancas estão os resíduos idênticos. Os resíduos de ligação ao substrato estão marcados com fundo amarelo. O resíduo de lisina essencial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

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

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

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

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

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

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

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

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

Uma nova série de inibidores alostéricos da DHS de *H. sapiens* foi desenvolvida por um grupo de pesquisadores ao executarem otimização de moléculas encontradas por rastreamentos em larga escala (TANAKA et al., 2020a, 2020b). Dois novos potentes inibidores, **11g** (IC₅₀ = 0,062 µM) e **26d** (IC₅₀ = 0,0092 µM), foram desenvolvidos, o que ressalta a importância das campanhas de rastreamento em larga escala seguidas de etapas de otimização de moléculas e também da descoberta de novos de sítios de ligação para DHS (TANAKA et al., 2020a, 2020b).

Baseando-se no sítio alostérico descrito para a DHS de *H. sapiens* (TANAKA et al., 2020a), uma outra série de inibidores alostéricos foram sintetizados (LIU et al., 2021). O inibidor **8m** apresentou potente inibição *in vitro* da atividade enzimática da DHS de *H. sapiens* (IC₅₀ = 0,014 µM) e também foi capaz de inibir células de melanoma *in vitro* (LIU et al., 2021).

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

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

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

1.4. Estratégias de descoberta de drogas específicas ao alvo

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

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

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

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

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

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

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

5. CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- LEE, M. E. et al. A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. **ACS Synthetic Biology**, v. 4, n. 9, p. 975–986, 18 set. 2015.
- LI, L. et al. EIF5A expression and its role as a potential diagnostic biomarker in hepatocellular carcinoma. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 16, p. 4774–4779, 11 jun. 2021.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, In Vitro Models for Selection of Development Candidates. v. 23, n. 1, p. 3–25, 15 jan. 1997.
- LIU, J. et al. Translational Regulation of HIV-1 Replication by HIV-1 Rev Cellular Cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 308–321, 1 jun. 2011.
- LIU, K. et al. Novel Allosteric Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase against Malignant Melanoma: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 18, p. 13356–13372, 23 set. 2021.
- MADHAVI SASTRY, G. et al. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 27, n. 3, p. 221–234, 1 mar. 2013.
- MAIER, B.; TERSEY, S. A.; MIRMIRA, R. G. Hypusine: a New Target for Therapeutic Intervention in Diabetic Inflammation. **Discovery Medicine**, v. 10, n. 50, p. 18–23, 30 jun. 2010.
- MANDAL, A.; MANDAL, S.; PARK, M. H. Global quantitative proteomics reveal up-regulation of endoplasmic reticulum stress response proteins upon depletion of eIF5A in HeLa cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25795, 16 maio 2016.
- MANJUNATH, H. et al. Suppression of Ribosomal Pausing by eIF5A Is Necessary to Maintain the Fidelity of Start Codon Selection. **Cell Reports**, v. 29, n. 10, p. 3134–3146.e6, 3 dez. 2019.
- MAO, X. et al. MET3 Promoter: A Tightly Regulated Promoter and Its Application in Construction of Conditional Lethal Strain. **Current Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 37–40, 1 jul. 2002.
- MARILLONNET, S.; GRÜTZNER, R. Synthetic DNA Assembly Using Golden Gate Cloning and the Hierarchical Modular Cloning Pipeline. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 130, n. 1, p. e115, 2020.
- MARTINEZ-ROCHA, A. L. et al. Posttranslational hypusination of the eukaryotic translation initiation factor-5A regulates *Fusarium graminearum* virulence. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24698, 21 abr. 2016.
- MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected Tropical Diseases: Epidemiology and Global Burden. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 2, n. 3, p. 36, 5 ago. 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Artigo proveniente desse projeto de pesquisa

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

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