RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2021.

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 S*accharomyces 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

Silva, Suelen Fernandes
S586e 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 prolinas..... 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 *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)..... 22

Figura 5. Sobreposição dos resíduos do sítio ativo entre a DHPS de humano e as DHPS de *Trypanosoma brucei* e representação da complementação do sítio de ligação a NAD+ em *Trypanosoma brucei*..... 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 *L. major*..... 45

Figura 10. Alinhamento global entre as sequências de DHPS de *Homo sapiens* (1RLZ) e as isoformas A (A) e B (B) de DHPS de *Leishmania major*..... 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 *L. major* no vetor de expressão pSP-GM1..... 56
Figura 17. Complementação funcional da deleção de *Sc*DHPS pelas isoformas de DHPS de *Leishmania major*..... 58
Figura 18. Crescimento e hipusinação diferencial entre as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* complementadas pela DHPS de Homo sapiens e pelas DHPSs de *Leishmania major*..... 60
Figura 19. Efeito do GC7 no crescimento celular entre linhagens de *S. cerevisiae* expressando a DHPS de humano e as DHPSs de *Leishmania major*..... 62
Figura 20. Modelo molecular comparativo da desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major*..... 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 *Saccharomyces cerevisiae* utilizada nesse trabalho..... 27

Tabela 2. Linhagens de *E. coli* 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 *L. major*..... 29

Tabela 6. Sequência dos primers utilizados para amplificações da isoforma B da DHPS de *L. major*..... 30

Tabela 7. Sequência dos oligonucleotídeos usados para amplificação das isoformas A e B de DHPS de *L. major*..... 39

Tabela 8. Anticorpos utilizados nesse trabalho..... 43

Tabela 9. Combinações de primers e construções geradas para a isoforma A de DHPS de *Leishmania major* (LmDHPSA)..... 47

Tabela 10. Combinações de primers e construções geradas para a isoforma B de DHPS de *Leishmania major* (LmDHPSB)..... 47

Tabela 11. Comparação entre os resíduos dos sítios de ligação à NAD entre *Homo sapiens*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*... 66

Tabela 12. Tabela 12. Comparação entre os resíduos dos sítios de ligação à GC7 à 6Å de distância entre *Homo sapiens*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*..... 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	*n-Dodecil-beta-D-maltoside*
DHPS	desoxi-hipusina sintase
D.O.600nm	densidade óptica a 600nm
DOHH	desoxi-hipusina hidroxilase
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eIF5A	*eukaryotic translation initiation factor 5A*
g	grama
GC7	N1-guanil-1,7-diaminoheptano
h	hora
HEPES	*2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid*
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	*β-nicotinamide adenine dinucleotide*
NADH	*β-nicotinamide adenine dinucleotide reduced*
ng	nanograma
Ni-NTA	matriz de ácido nitriloacético-níquel
nm	nanômetros
N-terminal	amino-terminal
pb	pares de base
PBS	*phosphate buffered saline*
PBST	PBS adicionado de 0,05% de Tween-20

PCR	*polymerase chain reaction*
PEI	Polietilenimina
pH	potencial hidrogeniônico
PCT	centro da peptidil transferase
PDB	*Protein Data Bank*
rpm	rotações por minuto
s	segundo
SC	meio sintético completo para levedura
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEM	*standard error of mean*
SGC	*Structural Genomics Consortium*
TB	meio *Terrific Broth*
*Tb*DHSc	desoxi-hipusina sintase catalítica de *Trypanosoma brucei*
*Tb*DHSp	desoxi-hipusina sintase prozima de *Trypanosoma brucei*
TCEP	*Tris(2-carboxyethyl)phosphine*
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 *Leishmania major*..... 29

3.1.1. PCR de colônia 32

3.2. Produção das enzimas desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major*..... 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 *in vitro* 36

3.4. Verificação de complementação de *Sc*DHPS pelas isoformas de desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major*..... 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 *Saccharomyces cerevisiae* 41

3.4.7. *Western blot*..... 42

3.5. Análise molecular entre os sítios de ligação à NAD+ e GC7 em *Homo sapiens, Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*..... 44

3.5.1. Geração do modelo molecular por homologia de DHPS de *Leishmania major*..... 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 *Leishmania major*..... 45

4.2. Purificação das enzimas desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major* 48

4.2.1. Expressão em pequena escala das enzimas DHPS de *Leishmania major*..... 48

4.2.2. Expressão em larga escala das enzimas DHPS de *Leishmania major* 50

4.3. Verificação de complementação de *Sc*DHPS pelas isoformas de desoxi-hipusina sintase de *Leishmania major* 55

4.3.1. Clonagem em vetor de expressão em *Saccharomyces cerevisiae* 55

4.3.2. Análise da capacidade de complementação de DHPS de *Saccharomyces cerevisiae* pelas enzimas de *Leishmania major* 56

4.3.3. Análise do crescimento diferencial entre as linhagens complementadas em *Saccharomyces cerevisiae* 58

4.3.4. Análise da sensibilidade ao GC7 usando ensaio de crescimento comparativo em *Saccharomyces cerevisiae* 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 *Leishmania major* 61

4.4.2. Comparação entre os sítios de ligação a NAD e GC7 de *Homo sapiens, Leishmania major e Trypanosoma brucei* 63

5. CONCLUSÃO 70

6. REFERÊNCIAS 72

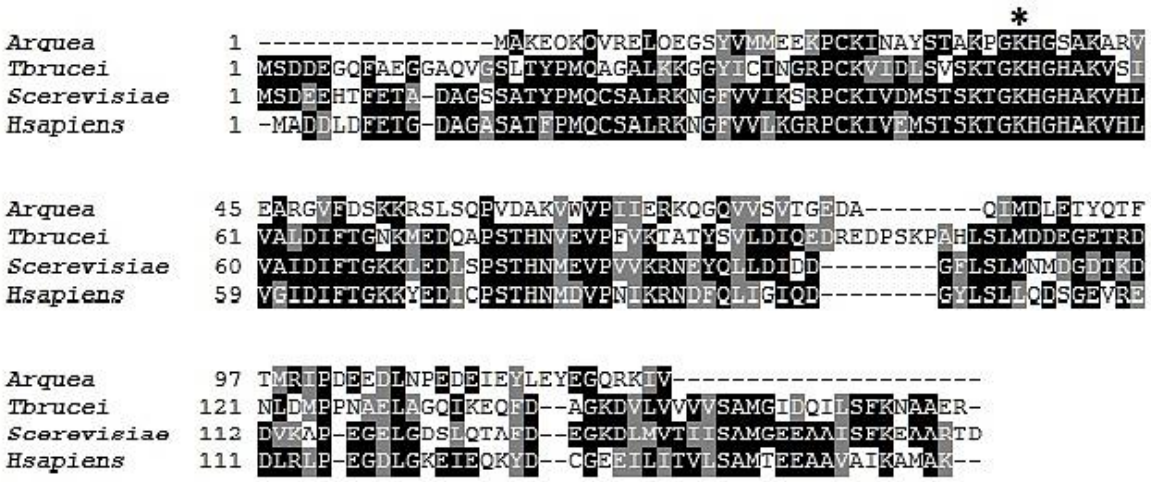
ANEXO I 78

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, elongação, 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.

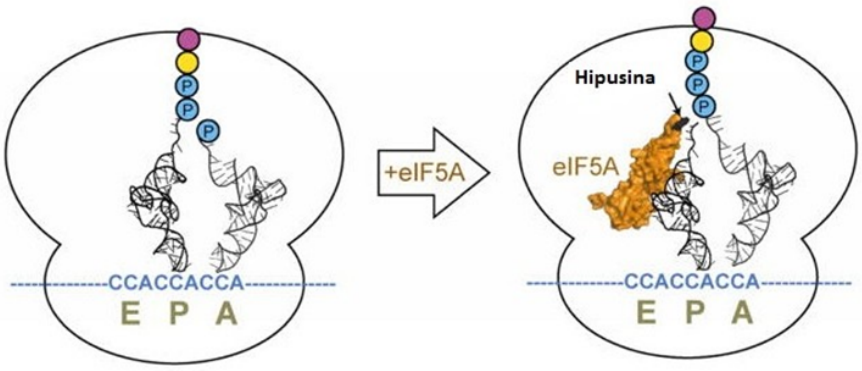


Um fato que chama atenção para eIF5A é sua modificação pós-traducional exclusiva e necessária para seu funcionamento, conhecida como hipusinação (detalhada mais adiante nesta dissertação; (PARK et al., 2010). Esta modificação

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 elongação 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 elongação 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 elongação 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 prolil-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).

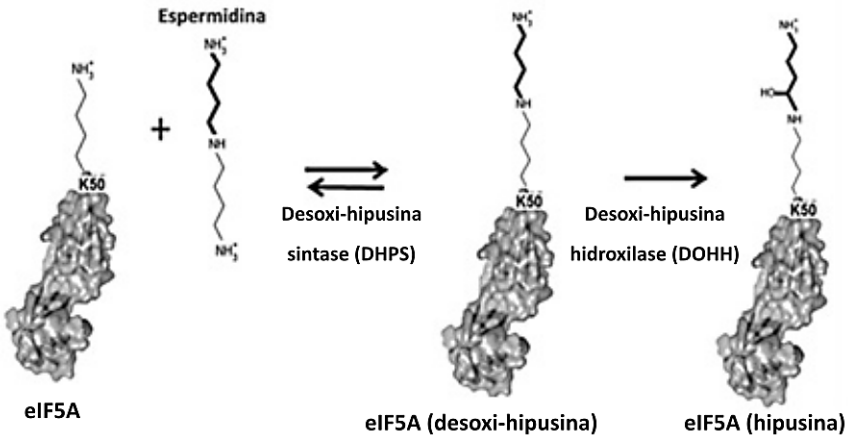
A essencialidade de eIF5A e outros efeitos celulares e fisiológicos da inibição da sua função em diferentes organismos faz com que eIF5A seja um interessante alvo para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Por exemplo, existe extensa literatura de correlação entre a expressão elevada de 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 oxido 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 eIF2α

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 agronômica (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:** resídudos de aminoácidos idênticos. **Cinza:** aminoácidos similares. **Seta verde:** Lisina essencial para a atividade catalítica de DHPS.

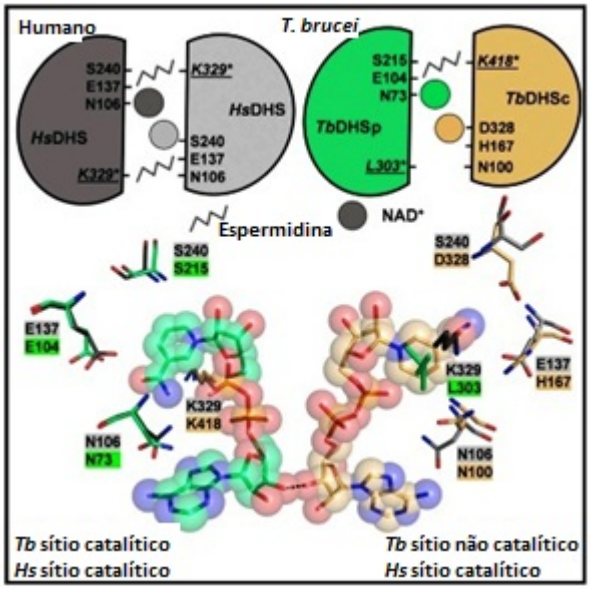
```
TbDHSc          1 --------------------------------MAELAKSAVLVSSCTDDLLGDAKQVVVG
LmajorA         1 --------------------------------MANIAESAVLVSSASSAQAVAKLTQVQG
Hsapiens        1 MEGSLEREAP------------------------AGALAAVLK---HSSTLPPESTQVRG
Scerevisiae     1 -MSDINEKLP------------------------ELLQDAVLK---ASVPIPDDFVKVQG
TbDHSp          1 ----------------------------------------------MSGVPFPSRVIGD
LmajorB         1 MLASAPAPRPAKKDSAASRRKSASKSTGAAVKDDSSARVSASG---AAESPEQSCTQVHG

TbDHSc         29 PNQEDL------HSAEAVLNRYSTVGFQASNLARAFSICEMMLTPQSPSPSLMPTEGDQ-
LmajorA        29 P-TSGF------DKAQHIIGSYSTMGFQATNYGLARSIAQRMIRKQPPSKVYQIKDGKYV
Hsapiens       34 YDFNRG------VNYRALLEAFGTTGFQATNFGRAVQQVNAMIEKKLEPLS---------
Scerevisiae    33 IDYSKPEA--TNMRATDLIEAMKTMGFQASSVGTACEIIDSMRSWRGKHID---------
TbDHSp         14 LDYSNLLNIGQEEAIRCVLNAYPNIGLEATNLGRARRIVQRALND----------------
LmajorB        58 VDFQSLVHATQEETLRAVVSSLPTTGLQATQIGRARQLVQQILHH----------------

TbDHSc         82 ----------ASESPVMVQPTLFVGVTANLFGTGCREAIRFLCTECVPLPNGVEPATPL-
LmajorA        82 LVPPDVGEDGRTLQQEHVYPNLFMGVSANLMGTGCREAVRFLVQEGVAHRSPEASAAASA
Hsapiens       79 -QDEDQHADLTQSRRPLTSCTIFLGYTSNLISSGIRETIRYLVQHNM--------------
Scerevisiae    82 -ELDDHEKKGCFDEEGYQKTTIFMGYTSNLISSGVRETLRYLVQHKM--------------
TbDHSp         59 --------------NGMDGNKVMLAYTSNLISSGLRDTFACLARENR--------------
LmajorB       103 --------------RS-PEDRVFLAYTSNMISCGLRDTFTYLARERL--------------

TbDHSc        131 ---DD------MAGIS---CDGTGALKPSPCDSRALIHVLVVSGGAMEHDIRRACESYKL
LmajorA       142 DGTDDQLMFARLKREYVETYGGPPHPDEEVPRAHSFLCAIVVSGGGVEHDLRRACTAYTL
Hsapiens      125 ------------------------------------VDVLVTTAGGVEEDLIKCLAPTYL
Scerevisiae   128 ------------------------------------VDAVVTSAGGVEEDLIKCLAPTYL
TbDHSp         92 ------------------------------------IGAVVTTAGGVEEDVIKCLGDTLV
LmajorB       135 ------------------------------------VDCFISSAGGIEEDVIKCGGSTLL

TbDHSc        179 SRDGAEEEGEQF------------------HHPVERDRSRSKGTDCHFGNVRYNSSGVAS
LmajorA       202 HYYASEAQGHVSSTISSEATAPLEGLQQRAETPLGTGAAAGAAKPARFGNVEYPPQGSPG
Hsapiens      149 GEFSLRG------------------------------KELRENGINRIGNLLVPNENY--
Scerevisiae   152 GEFALKG------------------------------KSLRDQGMNRIGNLLVPNDNY--
TbDHSp        116 GDFALND------------------------------HALRNNGLNRVGNLLVPNDNY--
LmajorB       159 GQFGLDG------------------------------RALRRRGINRIGNLLVPNDNY--

TbDHSc        221 RNLFSCVMRCLVKRLAEAQRKEKANREAAPIPEAYYDVCSWAITPSTLWYMAGLWMADIF
LmajorA       262 SALFDRLMRTFAQRLCARQARLRAAAMAKPIPDKYDDVCSWSVTPSEVWALCGLWLVDML
Hsapiens      177 -CKFEDWLMPILDQMVMEQN-----------------TEGVKWTPSKMIARLGKEI----
Scerevisiae   180 -CKFEEWIVPILDKMLEEQDEYVKKHGAD-CLEANQDVDSPIWTPSKMIDRFGKEI----
TbDHSp        144 -RNFEDFFVPLLRRLHEQQRDSR----------------WTTKTTPSQIIAEIGAAL----
LmajorB       187 -CWFEDFFTPVLESVQEAQRASR----------------WKTHTAPSEFIEAMGAAI----
```

```
TbDHSc        281 TEALQETGEVT-------------------------------DEKVASEEGLKRAKSTVL
LmajorA       322 AEALRAVQSCPSHLTSGSGVGTAESVTANGKGQEADRDAHIATSALYRAEALARARTTVV
Hsapiens      215 ------------------------------------------------N------NPESVY
Scerevisiae   234 -----------------------------------------------N------DESSVL
TbDHSp        184 ---------------------------------------------ESVRPNDCGSSLI
LmajorB       227 ---------------------------------------------AKNHPDTCTSSLV

TbDHSc        310 YWAARNGVPIFSPSLTDGDIMEFILTAGD-------------------------------
LmajorA       382 YWAAVQQVSLFSPSFVDGDITSYLLPTPVPAARPAHRKGGSVADESAANSKELKRRRKAS
Hsapiens      222 YWAQKNHIPVFSPALTDGSLGDMIFFHSYK------------------------------
Scerevisiae   241 YWAHKNKIPIFCPSLTDGSIGDMLFFHTFK------------------------------
TbDHSp        197 YWCYRNDIPVFSPAFTDGSMGDMIYFYNYS------------------------------
LmajorB       240 YWCYRNGISVFSPAFTDGSMGDMIYFYNFS------------------------------

TbDHSc        339 --------------TGVPLLQLDLVADIHRLNRLAMR---SRRTGMMILGGGVVKHHVCN
LmajorA       442 SSSPTAATAVEDEPPVVERLQIDLVRDVYSINKLAML---SKKTGMLICGGGVVKHHVCN
Hsapiens      252 --------------NP--GLVLDIVEDLRLINTQAIF---AKCTGMIILGGGVVKHHIAN
Scerevisiae   271 --------------ASPKQLRVDIVGDIRKINSMSMA---AYRAGMIILGGGLIKHHIAN
TbDHSp        227 ----------------RKGLVVDPVPDVRRLRQLGCKSTNVGRITCIVLGAGLPKHHLLR
LmajorB       270 ----------------HKGLVVDPLEDVVRLRKLAAKE--KGRNLAIVLGGGLPKHHLLR

TbDHSc        382 ANLMRNGADYAVFLNNAQEFDGSDAGARPGEAVSWGKLRLDSTAVKVYSEVTIVFPLIVV
LmajorA       499 ANLMRNGADFTIILNNGQEFDGSDAGAKPEEALSWGKVRMEGAFVKVYGEVSTYLPLLVA
Hsapiens      293 ANLMRNGADYAVYINTAQEFDGSDSGARPDEAVSWGKIRVDAQPVKVYADASLVFPLLVA
Scerevisiae   314 ACLMRNGADYAVYINTGQEYDGSDAGARPDEAVSWGKIKAEAKSVKLFADVTTVLPLIVA
TbDHSp        271 N----VQADAVVYVTTGSDADGCESSCNVMADRANGLLSPNCDVVRVHGDATIISPLLLL
LmajorB       312 N----VSMDAVVMVTTGLEADGCVSSGVLADDVACGLLREETETVRVQGDATVVFPLMLI

TbDHSc        442 HVFVAWVRMMRSKGKENIRS-----------------------
LmajorA       559 DVFVPAVRQRRATDDAQPRRRQSSRGARLPQDVSGHSHLCRGE
Hsapiens      353 ETFAQKMDAFMHEKNED--------------------------
Scerevisiae   374 ATFASGKPIKKVKN-----------------------------
TbDHSp        327 RSSDGKEKVGVREDGN---------------------------
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 *Tb*DHSp 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 *Tb*DHSc como de *Tb*DHSp (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*. *Tb*DHSp*:* isoforma não funcional, *prozyme.* ***Tb*DHSc:** isoforma funcional. ***Hs*DHS:** DHPS de *Homo sapiens.* As sequências de *Hs*DHS, *Tb*DHSp e *Tb*DHSc 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.*

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 Biphys 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. Crypstoporidium 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 supress 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 O 2 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.