UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Avaliação da Atividade e Resistência à Clivagem Proteolítica de L-asparaginases Recombinantes Obtidas por Reação em Cadeia da Polimerase Propensa a Erro

Mariane Augusta Domingues Rodrigues

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Avaliação da Atividade e Resistência à Clivagem Proteolítica de L-asparaginases Recombinantes Obtidas por Reação em Cadeia da Polimerase Propensa a Erro

Mariane Augusta Domingues Rodrigues

Versão Original

Dissertação para a obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profª. Drª. Gisele Monteiro de Souza

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Rodrigues, Mariane Augusta Domingues
R696a Avaliação da atividade e resistência à clivagem proteolítica de L-asparaginases recombinantes obtidas por reação em cadeia da polimerase propensa a erro / Mariane Augusta Domingues Rodrigues. -- São Paulo, 2016.
136p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Souza, Gisele Monteiro de

1. Biotecnologia farmacêutica 2. Leucemia I. T. II. Souza, Gisele Monteiro de, orientador.

615.1 CDD

Mariane Augusta Domingues Rodrigues

Avaliação da Atividade e Resistência à Clivagem Proteolítica de L-asparaginases Recombinantes Obtidas por Reação em Cadeia da Polimerase Propensa a Erro

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profª. Drª. Gisele Monteiro de Souza
orientadora/presidente

_____
1º examinador

_____
2º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Prof[a]. Dr[a]. Gisele Monteiro de Souza por sua dedicação, auxílio e ensinamentos que têm contribuído para a minha formação científica e intelectual.

Aos meus colegas de laboratório, Samarina, Débora, Lucas, Mariana, Beatriz e especialmente Iris, Marcela e Karen, por me auxiliarem incansavelmente neste trabalho, tanto nos experimentos quanto na interpretação dos resultados. Especialmente à Karen, o meu agradecimento pelas conversas, consolos e conselhos.

Á minha mãe, professora e historiadora Joelza Ester Domingues Rodrigues, pelo incentivo e acolhimento.

Ao meu noivo, Rodrigo de Andrade Scognamiglio, por ser um grande companheiro em todos os momentos e fazer dos meus sonhos os seus próprios.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão de bolsa de mestrado, possibilitando a realização do presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa, através do Projeto Temático número 2013/08617-7.

RESUMO

RODRIGUES, M. A. D. **Avaliação da Atividade e Resistência à Clivagem Proteolítica de L-asparaginases Recombinantes Obtidas por Reação em Cadeia da Polimerase Propensa a Erro**

A L-Asparaginase II de *Escherichia coli* (EcA II) é uma enzima amplamente utilizada no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), atuando na depleção do aminoácido L-asparagina, o qual é fundamental para a multiplicação das células cancerosas. Contudo, o tratamento com a EcA II está associado a altos índices de hipersensibilidade, devido à formação de anticorpos anti-L-asparaginase e à clivagem da enzima pelas proteases sanguíneas asparagina endopeptidase (AEP) e catepsina B (CTSB). Também ocorre neurotoxicidade associada ao efeito L-glutaminase da enzima. O principal objetivo do presente trabalho é a obtenção de mutantes da EcA II (gene *ansB*) com equivalente eficiência catalítica, maior resistência à clivagem proteolítica e menor atividade glutaminase. Para este propósito, através da reação em cadeia da polimerase propensa a erro (epPCR) do gene *ansB*, foi construída uma biblioteca de 1128 clones expressos no vetor pET15b em BL21(DE3). Nenhum mutante com atividade asparaginásica equivalente à EcA II selvagem apresentou atividade glutaminásica inferior à esta. Dentre os clones triados obtivemos um mutante (T161I) resistente à clivagem proteolítica pela CTSB e dois mutantes (Q190L e P40S/S206C) resistentes à clivagem proteolítica por ambas AEP e CTSB. Estes três mutantes apresentaram atividade asparaginásica e glutaminásica equivalentes a EcA II selvagem. Nossos resultados mostram promissoras possibilidades de EcA II mutantes com maior estabilidade frente às proteases sanguíneas humanas e possivelmente menos imunogênicas.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; Biofármaco; L-asparaginase; Reação em Cadeia da Polimerase Propensa a Erro; Evolução Sintética de Proteínas; Catepsina B; Asparagina Endopeptidase, Leucemia Linfóide Aguda.

ABSTRACT

RODRIGUES, M. A. D. **Evaluation of the Activity and Resistance to Proteolytic Cleavage of Recombinant L-asparaginases Obtained by Error-Prone Polymerase Chain Reaction**

Escherichia coli L-asparaginase (EcA II) is an enzyme widely used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), acting in the depletion of the amino acid L-asparagine, which is essential for cancer cells proliferation. However, treatment with L-asparaginase is associated with a high rate of hypersensitivity, due to formation of anti-L-asparaginase antibody and the enzyme cleavage by the serum proteases asparagine endopeptidase (AEP) and cathepsin B (CTSB). Furthermore, the neurotoxicity is associated with the effect of the enzyme L-glutaminase activity. The main aim of the current work is to obtain variants of EcA II (gene *ansB*) with an equivalent catalytic efficiency, greater resistance to proteolytic cleavage and a reduced glutaminase activity. For such purpose, through error-prone polymerase chain reaction (epPCR) of gene *ansB,* a library of 1128 clones was constructed in pET15b vector and expressed in BL21(DE3). None mutant with an asparaginase activity equivalent to EcA II wild type showed a reduced glutaminase activity. Among the screened clones, one mutant (T161I) was resistant to CTSB proteolytic cleavage and two mutants (Q190L e P40S/S206C) were resistant to both CTSB and AEP proteolytic cleavages. These three mutants were EcA II wild type equivalents in asparaginase and glutaminase activities. Our data show promising new possibilities of mutant EcA II presenting higher stability against human serum proteolytic cleavage and maybe lower immunogenicity.

Keywords: *Escherichia coli*; Biopharmaceutical; L-asparaginase; Error-prone Polymerase Chain Reaction, Synthetic Evolution of Proteins; Cathepsin B; Asparagine Endopeptidase, Acute lymphoblastic leukemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resultado da eletroforese em SDS-Page do medicamento Kidrolase®. .73

Figura 2 – Resultado da eletroforese em SDS-Page de amostras obtidas após expressão pelas cepas de *E. coli* BL21(DE3). 76

Figura 3 – Construção dos clones do gene *ansB* em vetor de super expressão pET15b.....82

Figura 4 – Representação da estrutura cristalográfica da EcA II em *cartoon* (imagens A, B, C, E, G e I) e superfície (imagens D, F, H e J). 89

Figura 5 – Resultado da eletroforese em SDS-Page das frações periplasmáticas dos padrões e dos mutantes.....94

Figura 6 – Purificação da EcA II selvagem por troca aniônica 98

Figura 7 – Purificação da EcA II selvagem por exclusão molecular.....99

Figura 8 - Resultado da susceptibilidade da EcA II selvagem e dos mutantes após a incubação com as proteases CTSB e AEP 109

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação da atividade por mililitro (U/mL) de L-asparaginase selvagem, obtida a partir da construção em pET15b, transformada nas cepas de *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS, após 3 e 22 horas de indução.....77

Gráfico 2 – Comparação da Atividade Específica (U/mg) pelo método de Nessler da EcA II selvagem, obtida a partir da construção BL21(DE3)/pET15b + *ansB* selvagem, após os tempos de reação de 10, 15, 20, 25 e 30 min.....79

Gráfico 3 – Comparação da Atividade Específica (U/mg) pelo método de Nessler da EcA II selvagem, obtida a partir da construção BL21(DE3)/pET15b + *ansB* selvagem, após 10 min de reação, com e sem a adição de glicina 100 mM. 80

Gráfico 4 – Resultado da triagem dos 1128 clones produzidos por epPCR do gene *ansB* da EcA II selvagem 83

Gráfico 5 – Comparação da Atividade (U/mg de proteína total) das frações periplasmáticas da EcA II selvagem (padrão positivo) e de clones produzidos por epPCR.....86

Gráfico 6 – Comparação da Atividade (U/mg de proteína total) das frações periplasmáticas da EcA II selvagem (coluna cinza) e dos seis mutantes (colunas com pontos: K22R, T80M/K139N, P40S/S206C, T161I, Q190L, V154M) produzidos por epPCR.....95

Gráfico 7 – Comparação da Atividade Glutaminásica (% da Atividade Asparaginásica) das frações periplasmáticas da EcA II selvagem (coluna cinza) e dos seis mutantes (colunas com pontos: K22R, T80M/K139N, P40S/S206C, T161I, Q190L, V154M) produzidos por epPCR.....96

Gráfico 8 – Curva de calibração da coluna cromatográfica de exclusão molecular Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Life Sciences). 100

Gráfico 9 – Caracterização cinética da atividade asparaginásica da **(A)** EcA II selvagem e das mutantes **(B)** K22R, **(C)** V154M, **(D)** T161I, **(E)** Q190L, **(F)** P40S/S206C e **(G)** T80M/K139N, ...105

Gráfico 10 – Caracterização cinética da atividade glutaminásica da **(A)** EcA II selvagem e das mutantes **(B)** K22R, **(C)** V154M, **(D)** T161I, **(E)** Q190L, **(F)** P40S/S206C e **(G)** T80M/K139N, ...106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das mutações sítio-dirigidas realizadas com L-asparaginases de diferentes organismos e seus benefícios obtidos.....36

Tabela 2 – Análise da expressão solúvel de L-asparaginase 48

Tabela 3 – Componentes e suas concentrações na epPCR realizada com o *kit GeneMorph II* ®.....56

Tabela 4 – Condições do ciclo da epPCR realizada com o kit *GeneMorph II* ®.....56

Tabela 5 – Resultado da quantificação da concentração da L-asparaginase no medicamento Kidrolase® pelo método de Bradford.....72

Tabela 6 – Resultado da quantificação da concentração da L-asparaginase no medicamento Kidrolase® pela absorbância da enzima em 280 nm.....73

Tabela 7 – Resultado da determinação das atividades absoluta (UI) e específica (UI/mg) em 5 mL do medicamento preparado Kidrolase® 74

Tabela 8 – Resultado da quantificação de proteína (mg/5mL) e da determinação das atividades absoluta (UI/5mL) e específica (UI/mg) após 15 e 25 dias da diluição do medicamento Kidrolase® 75

Tabela 9 - Características dos mutantes ativos de EcA II gerados após um ciclo de epPCR.....87

Tabela 10 – Predição dos sítios proteolíticos pra a CTSB na EcA II selvagem.....91

Tabela 11 – Volumes de eluição e massas molares relativas dos picos nos cromatogramas de exclusão molecular.....101

Tabela 12 – Atividades Específicas Asparaginásica e Glutaminásica.....102

Tabela 13 – Caracterização cinética da atividade L-asparaginásica.....103

Tabela 14 – Caracterização cinética da atividade L-glutaminásica.....103

Tabela 15 – Razão entre as constantes de especificidade para Asparagina e Glutamina da EcA II selvagem e seus mutantes 108

Tabela 16 – Resistência frente às proteases sanguíneas humanas da EcA II selvagem e seus mutantes.....108

LISTA DE ABREVIATURAS

AEP	Asparagina Endopeptidase
AHA	Ácido β-Hidroxamato Aspático (do inglês *β-Aspartohydroxamic Acid*)
BLAST	Ferramenta Básica de Procura por Alinhamento Local (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*)
BSA	Albumina de Soro Bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
CD	Dicroísmo Circular (do inglês *Circular Dichroism*)
Cont.	Continuação
CTSB	Catepsina B
DCase	Amidohidrolase N-Carbamoil-D-Aminoácido
ddNTPs	Dideoxirribonucleotídeos
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
DTT	Ditiotreitol
EcA	L-Asparaginase proveniente de *Escherichia coli*
EcA I	L-Asparaginase proveniente de *Escherichia coli* Tipo I
EcA II	L-Asparaginase proveniente de *Escherichia coli* Tipo II
EDTA	Acido Etileno Diamino Tetracético
GHA	Ácido γ-Hidroxamato Glutâmico (do inglês *γ-Glutamohydroxamic Acid*)
epPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Propensa a Erro (do inglês Error-Prone Polymerase Chain Reaction)
ErA	L-Asparaginase Proveniente de *Erwinia Chrysanthemi*
FDH	Formato Desidrogenase
HCl	Ácido Clorídrico
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (do inglês *Human Leukocyte Antigen*)
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil-β-D-1-Tiogalactopiranosídeo
K_{av}	Constante de Distribuição
k_M	Constante de Michaelis-Menten
$k_{0,5}$	Concentração de Substrato para Meia Saturação
k_{cat}	Constante Catalítica
LB	Meio de cultura Luria-Bertani

LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
$MgSO_4$	Sulfato de Magnésio
$MnCl_2$	Cloreto de Manganês
N/A	Não se aplica
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	Centro Nacional Americano para Informação Biotecnológica (do inglês *National Center for Biotechnology Information*)
n_H	Coeficiente de Hill
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de Amônio
PAA	Poliacrilamida
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polimerase Chain Reaction*)
PDB	Base de Dados de Proteínas (do inglês *Protein Data Bank*)
pET15b	Vetor plasmidial da empresa *Novagen*
pET15b Ø	pET15b vazio (*i. e.*, sem a inserção de nenhum gene na região de expressão)
PMSF	Fenil-Metil-Sulfonil Fluoreto
PSA	Persulfato de Amônio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium dodecyl sulfate*)
SDS-Page	Eletroforese de Gel de Poliacrilamida e Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	Polimorfismo Único de Nucleotídeo (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*)
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris	2-Amino-2-Hidroximetil-Propano-1,3-Diol
$V_{máx.}$	Velocidade Máxima
V_0	Velocidade Inicial
v_e	Volume de eluição
v_o	Volume morto
vs	*versus*
[S]	Concentração de substrato
[E]	Concentração de enzima

Abreviaturas de Aminoácidos

A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
C	Cys	Cisteína	N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato	P	Pro	Prolina
E	Glu	Glutamato	Q	Gln	Glutamina
F	Phe	Fenilalanina	R	Arg	Arginina
G	Gly	Glicina	S	Ser	Serina
H	His	Histidina	T	Thr	Treonina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina
K	Lys	Lisina	W	Trp	Triptofano
L	Leu	Leucina	Y	Tyr	Tirosina

Abreviaturas de Nucleotídeos

A	Adenina	Purinas
G	Guanina	
T	Timina	Pirimidinas
C	Citosina	

LISTA DE UNIDADES

g	aceleração gravitacional
%	por cento
% (p/v)	por cento peso em volume (*i.e.,* número de gramas em 100 mililitros)
% (v/v)	por cento volume em volume (*i.e.,* número de mililitros em 100 mililitros)
°C	graus Celcius
µg	microgramas
µL	microlitros
µM	micromolar
cm	centímetros
Da	Dalton
dL	decilitros
g	gramas
h	horas
kb	kilobase
kDa	kilo Dalton
kV	kilovolts
L	litros
M	molar
mg	miligramas
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
ms	milisegundos
ng	nanogramas
pb	pares de base
pg	picogramas
pmol	picomol
rpm	rotações por minuto
s	segundos
U	unidade
v	volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21

2.1. L-ASPARAGINASE 21

2.1.1 Estrutura e Atividade 21

2.1.2 Eventos Adversos 25

2.1.2.1 Hipersensibilidade e formação de anticorpos anti-L-asparaginase 25

2.1.2.2 Inativação por clivagem proteolítica 27

2.1.2.3 Atividade glutaminásica 29

2.1.2.4 Outros Eventos Adversos 31

2.1.3 Melhoramento da L-asparaginase por engenharia de proteínas 32

2.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PROPENSA A ERRO 37

3. OBJETIVOS 41

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL 41

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 41

4. MATERIAIS E MÉTODOS 42

4.1 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE 42

4.2 ESTABELECIMENTO DO PADRÃO DE L-ASPARAGINASE SELVAGEM 43

4.2.1 Construção do padrão de L-asparaginase selvagem (controle positivo) . 43

4.2.1.1 Mini Preparação de Vetores Plasmidiais 44

4.2.1.2 Transformação das cepas de *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS 45

4.2.2 Construção do controle negativo 46

4.2.3 Produção da enzima recombinante 47

4.2.3.1 Cultivo e indução 47

4.2.3.2 Obtenção e avaliação da enzima L-asparaginase 47

4.2.3.3 Choque osmótico e obtenção da fração periplasmática 48
4.2.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-Page) 49
4.2.3.5. Quantificação da concentração de proteína total 50
4.2.3.5.1 Estimativa da concentração de L-asparaginase nas amostras não purificadas 51
4.2.3.6 Determinação da atividade enzimática de L-asparaginase 51
4.2.3.7 Otimização da determinação da atividade enzimática de L-asparaginase 52
4.2.3.8 Otimização do cultivo e produção de L-asparaginase em microplacas de 96 poços 53
4.3 PRODUÇÃO DA BIBLIOTECA DE POSSÍVEIS MUTANTES (CLONES) 54
4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase Propensa a Erro 54
4.3.2 Digestão do Produto de epPCR e do vetor de expressão pET15b 57
4.3.3 Ligação do Produto de epPCR ao vetor de expressão pET15b 58
4.3.4 Transformação da bactéria *E. coli* BL21(DE3) 58
4.3.5 Criopreservação da biblioteca de clones 59
4.4 TRIAGEM DOS CLONES PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE ATIVA 59
4.4.1 Cultivo e Indução 60
4.4.2 Choque Osmótico, Atividade e Quantificação de Proteína Total 60
4.4.3 Sequenciamento dos Clones 62
4.4.4 Análise *in silico* das Mutações Obtidas 63
4.4.5 Confirmação da Equivalência das Atividades Asparaginásicas 64
4.4.6 Determinação da Porcentagem de Atividade Glutaminásica por Hidroxamato 64
4.5 PURIFICAÇÃO 66
4.5.1 Cromatografia de Troca Aniônica 66
4.5.2 Cromatografia de Exclusão Molecular 67
4.5.2 Verificação da estrutura quartenária 67

4.6 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DOS MUTANTES OBTIDOS 68
4.6.1 Ensaio Acoplado à Glutamato Desidrogenase 69
4.7 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À CLIVAGEM PROTEOLÍTICA 70
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 72
5.1 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE UTILIZADOS 72
5.2 ESTABELECIMENTO DO PADRÃO DE L-ASPARAGINASE SELVAGEM 75
5.2.1 Otimização da determinação da atividade enzimática de L-asparaginase 78
5.2.2 Otimização do cultivo e produção de L-asparaginase em microplacas....80
5.3 PRODUÇÃO DA BIBLIOTECA DE CLONES 81
5.4 TRIAGEM DOS CLONES PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE ATIVA 83
5.4.1 Sequenciamento dos Clones com Atividade Semelhante a do Padrão....85
5.4.2 Análise *in silico* das Mutações Obtidas 86
5.4.2.1 Análise da localização das mutações.....87
5.4.2.2 Predição de alterações na atividade glutaminásica.....90
5.4.2.3 Interferência nos sítios preditos para AEP e CTSB 91
5.4.2.4 Conservação evolutiva das mutações 92
5.4.3 Confirmação da Equivalência entre as Atividades Asparaginásicas 93
5.4.4 Determinação da Porcentagem de Atividade Glutaminásica 95
5.5 PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO GRAU DE OLIGOMERIZAÇÃO.....97
5.6 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....101
5.7 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À CLIVAGEM PROTEOLÍTICA 108
6. CONCLUSÕES 112
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....113
REFERÊNCIAS.....114
ANEXO A – FLUXOGRAMA DO DESENHO EXPERIMENTAL 123
ANEXO B – MAPA DO VETOR PLASMIDIAL pET 15b 124

ANEXO C – PRODUÇÃO DA BIBLIOTECA DE MUTANTES 125

ANEXO D – TRIAGEM DOS MUTANTES PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE ATIVA 126

ANEXO E – ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS À ECA II 128

ANEXO F – CROMATOGRAMAS DO PADRÃO *BLUE DEXTRAN 2000* 131

ANEXO G – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE MASSA MOLAR.....132

ANEXO H – INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS DE MESTRADO/DOUTORADO 133

ANEXO I – DISPENSA DA ANÁLISE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA....134

ANEXO J – FICHA DO ALUNO.....135

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é a neoplasia maligna de maior ocorrência em crianças, compondo quase um terço de todos os cânceres pediátricos. Na LLA, os genes envolvidos no desenvolvimento normal de células B e células T têm as suas expressões alteradas nas células progenitoras linfoides, levando a uma proliferação desregulada e a um aumento de células imaturas no sangue (KANVAR, 2013).

Um importante agente quimioterápico utilizado no tratamento da LLA infanto-juvenil é a enzima bacteriana L-asparaginase, a qual pode ser utilizada também em outras desordens linfoproliferativas e linfomas (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Esta enzima atua através da depleção do aminoácido L-asparagina – fundamental para a multiplicação das células cancerosas. Também depleta, em menor grau, o aminoácido L-glutamina (PIETERS et al., 2011).

Atualmente, três tipos da enzima têm sido utilizados para o tratamento da LLA: L-asparaginase nativa derivada de *Escherichia coli* (EcA II) e sua forma peguilada, e L-asparaginase isolada de *Erwinia chrysanthemi* (ErA) (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; PIETERS et al., 2011).

Apesar da excelente eficácia da L-asparaginase, com índices de cura próximos a 80%, a enzima também está associada a consideráveis índices de reações de hipersensibilidade e de “inativação silenciosa” – eventos que têm sido associados à produção de anticorpos anti-L-asparaginase (PIETERS et al., 2011). Alguns estudos sugerem que estes eventos estejam associados às cisteíno-proteases séricas humanas, como a asparagina endopeptidase (AEP) e a catepsina B (CTSB). Através da hidrólise das L-asparaginases bacterianas, essas proteases levam à inativação da enzima circulante e evidenciam epítopos da mesma, que funcionam como mediadores da resposta imune dos pacientes (PATEL et al., 2009; OFFMAN et al., 2011).

Outro efeito adverso da L-asparaginase é a neurotoxicidade, que, apesar de raramente ocorrer em crianças, acomete até 25% dos pacientes adultos tratados com a enzima. Acredita-se que a neurotoxicidade dá-se pela depleção de L-asparagina e L-glutamina no cérebro (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). A depleção de L-glutamina está também associada à imunossupressão, pancreatite, danos

hepáticos, hiperglicemia e anormalidades no sistema de coagulação sanguínea (SUDHIR et al., 2014; RAMYA et al., 2011).

Devido ao alto potencial de cura, mas também aos graves eventos adversos, muitos pesquisadores têm buscado por L-asparaginases alternativas de outros organismos, ou produzidas por mutações sítio-dirigidas, que sejam mais ativas e estáveis, menos imunogênicas, e com menor atividade glutaminase (CHAN et al., 2014; MEENA et al., 2015; MEHTA et al. 2014; SUDHIR et al., 2014; VERMA et al., 2014; VIDYA, USHASREE e PANDEY, 2014; OFFMAN et al., 2011; RAMYA et al., 2011; REINERT et al. 2006).

Contudo, pelo atual conhecimento do grupo, não foram encontrados trabalhos publicados que utilizassem a reação em cadeia polimerase propensa a erro (epPCR) como estratégia para a obtenção de uma L-asparaginase otimizada. A epPCR é um método de evolução sintética de proteínas, que tem sido extensamente utilizado no melhoramento de enzimas industriais (LABROU, 2010), e acredita-se que possa ser de grande valia para o melhoramento da L-asparaginase.

Neste contexto, a proposta do presente trabalho foi o emprego da epPCR para a produção de mutantes da EcA II, buscando-se a obtenção de mutantes com menor atividade L-glutaminásica e maior resistência às proteases AEP e CTSB, sem, porém, perder a atividade L-asparaginásica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. L-ASPARAGINASE

2.1.1 Estrutura e Atividade

As L-asparaginases são amidohidrolases (EC 3.5.1.1) que catalisam a reação de hidrólise de L-asparagina para L-aspartato e amônia, e, em menor grau, do aminoácido L-glutamina para L-glutamato e amônia (BOREK et al*.,* 2014; VERMA et al*.*, 2014). Estas enzimas estão presentes em bactérias, fungos, plantas e mamíferos; nos quais, sua ação primordial é formar aspartato, que pode ser transaminado em oxaloacetato, o qual participa do ciclo do ácido tricarboxílico, ou ser convertido em fumarato, durante o ciclo da uréia (YUN et al., 2007).

Como biofármaco, as L-asparaginases são utilizadas há mais de 40 anos no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) principalmente em pacientes pediátricos, nos quais leva a uma sobrevivência em longo prazo superior a 80% (LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010). A enzima é também utilizada no tratamento de outras leucemias, como leucemia linfocítica crônica, linfoma de Hodgkin, e leucemia mielocítica aguda (MEHTA et al., 2014).

A descoberta da ação antileucêmica das L-asparaginases ocorreu em 1953. Neste ano, um estudo publicado no *Journal of Experimental Medicine* revelou que o soro de porcos-da-índia possuía propriedade antitumoral, sendo esta posteriormente atribuída à atividade da enzima L-asparaginase presente neste soro (BOREK et al., 2014). Desde então, L-asparaginases de diversos organismos já foram estudadas, principalmente as provenientes de *Escherichia coli* (EcA) e *Erwinia chrysanthemi* (ErA), as quais atualmente são utilizadas na prática clínica.

Em *E. coli* estão presentes duas L-asparaginases: a tipo I (EcA I) e a tipo II (EcA II). A EcA I é expressa constitutivamente no citoplasma, sendo requerida para o crescimento da bactéria quando a única fonte de nitrogênio disponível é a asparagina. Como sua ação é no catabolismo dos aminoácidos intracelulares, a EcA

I possui baixa afinidade pelo substrato (K_M= 3,5 mM). Já a EcA II é expressa no periplasma, apenas em situações anaeróbicas e de escassez de nutrientes. Possui alta afinidade pelo substrato (K_M= 10-15 µM), a qual é essencial para que haja a captação da pouca asparagina presente no meio ambiente (YUN et al., 2007).

Outra diferença entre as duas L-asparaginases de *E. coli* é que apenas a EcA II possui propriedades antileucêmicas, tanto *in vitr*o quanto *in vivo*, e é utilizada no tratamento da LLA (BOREK et al., 2014; LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010; YUN et al., 2007).

Outra enzima utilizada na prática clínica é a enzima de *E. chrysanthemi,* a ErA, a qual também é periplasmática e possui alta afinidade pelo substrato (K_M = 29,1µM) (GERVAIS; FOOTE, 2014)

A EcA II possui ponto isoelétrico entre 4,6 e 5,5 (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007), enquanto o ponto isoelétrico da ErA é de aproximadamente 8,6 (GERVAIS; FOOTE, 2014).

Na clínica, após administração intravenosa da L-asparaginase, ocorre rápida depleção plasmática do aminoácido L-asparagina e, em menor escala, do aminoácido glutamina (PIETERS et al., 2011). Diversas células saudáveis do organismo humano possuem asparagina sintetase e são capazes de sintetizar a L-asparagina, a partir da L-glutamina (CHAN et al. 2014; NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Contudo, a asparagina sintetase não é expressa ou é expressa em baixas quantidades em determinados tipos de linfoblastos tumorais, levando-os a apoptose após a administração do biofármaco (CHAN et al. 2014; PATEL et al., 2009; NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Quando os linfoblastos tumorais produzem maiores quantidades de asparagina sintetase, o paciente é resistente ao tratamento com a L-asparaginase (CHAN et al. 2014).

A estrutura das L-asparaginases e as bases moleculares de sua atividade antitumoral começaram a ser elucidadas no início dos anos 1970, estando hoje disponíveis as estruturas cristalográficas de diversas L-asparaginases (BOREK et al., 2014).

Estruturalmente, estas enzimas são homotetrâmeros ABCD. Os monômeros de ambas EcA II e ErA apresentam cerca de 330 aminoácidos (34 kDa) em sua forma madura, distribuídos em dois domínios (N e C terminal), compostos por oito folhas β (domínio N terminal) e por quatro folhas β paralelas mais quatro α hélices (domínio C terminal) (LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010; NARTA;

KANWAR; AZMI, 2007). Uma característica presente nas L-asparaginases é uma sequência, em sentido anti-horário, altamente conservada entre as folhas β4 e β5, a qual está envolvida na atividade da enzima (LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010).

Apesar das quatro subunidades serem idênticas, estas enzimas são consideradas “dímeros de dímeros”, visto que os dímeros AC e BD, denominados “íntimos”, possuem maior número de interações de van-der-Waals (62 *vs* 31) e de pontes de hidrogênio inter-subunidades (42 *vs* 20) do que as interfaces A-D e B-C (VERMA et al., 2014).

Cada monômero possui um sítio ativo, localizado na interface entre os domínios N e C terminais dos dímeros “íntimos” (BOREK et al., 2014). Segundo estudos recentes, cada sítio ativo é composto por resíduos de três monômeros diferentes, o que explica porque a enzima não é ativa na forma monomérica. A exemplo, os substratos e produtos ligados ao sítio ativo do monômero C interagem também com resíduos do monômero A – principalmente Asn248 e Glu283 – assim como resíduos de ambos monômeros C e A interagem com os resíduos His183 e Asn184 do monômero D (VERMA et al., 2014).

Segundo Anishkin et al. (2015), na ligação da L-asparagina ao sítio ativo da L-asparaginase, os oxigênios da amida e do grupo carboxil do substrato são estabilizados pelas hidroxilas das cadeias laterais e pelos nitrogênios do esqueleto dos resíduos Thr12, Ser58 e Thr89. Já os resíduos Gln59, Asp90 e Glu283 estabilizam a amina positiva da L-asparagina, enquanto a amida é estabilizada pelo oxigênio do esqueleto da Ala114. Por fim, os resíduos Lys162 e Asn248 mantêm estável a rede de pontes de hidrogênio na enzima, sem interagir diretamente com o substrato. Estas interações com a L-asparagina ocorrem concomitantes, de maneira consistente e homogênia nos quatro sítios catalíticos da enzima. Já na ligação da L-glutamina ao sítio ativo da L-asparaginase, embora todas estas interações sejam possíveis, elas não ocorrem todas ao mesmo tempo de maneira consistente, o que explica a menor afinidade da enzima à este substrato (ANISHKIN et al., 2015).

De acordo com Labrou, Papageorgiou e Avramis (2010), as treoninas Thr12 e a Thr89, além da ligação ao substrato, são essenciais à atividade da enzima, e atuam em tríades catalíticas com os resíduos Tyr25 e Glu294 e com os resíduos Asp90 e Lys162, respectivamente (LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010) Já os resíduos 14 a 33 formam um *loop* flexível, o qual aberto permite o acesso dos

substratos ao sítio catalítico da enzima, e, fechado posiciona adequadamente os resíduos responsáveis pela catálise (BOREK et al., 2014; LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010). A flexibilidade deste *loop* é essencial para atividade enzimática, e a diminuição de sua mobilidade, que pode ocorrer na presença de zinco, está relacionada à redução desta atividade (BOREK et al., 2014)

O mecanismo de ação proposto para a EcA II é semelhante ao das serino-proteases. Em um primeiro passo, ocorreria um ataque nucleofílico no átomo de carbono da amida da L-asparagina, realizado pelo grupo hidroxila de um resíduo catalítico (Thr12 ou Thr89), levando a formação de um intermediário β-acil-enzima, que, em um segundo passo, sofreria um ataque nucleofílico de uma molécula de água, levando à formação dos produtos finais (BOREK et al., 2014).

Recentemente, através de estudos de modelagem molecular, Anishkin et al, (2015) propuseram que o ataque nucleofílico ocorreria apenas pela hidroxila da Thr12, em duas etapas, de menor energia e com maior estabilização do intermediário enzima-substrato. Na primeira etapa, o oxigênio da amida da asparagina seria protonado pelo hidrogênio da amina da Lys162, repassado através da hidroxila da Thr89, com a qual a Lys162 estabeleceria uma ponte de prótons (ponte T89-K162). Na segunda etapa, a asparagina protonada sofreria então o ataque nucleofílico em seu carbono da amida pelo oxigênio da hidroxila da Thr12. Segundo estes autores, quando a asparagina está no sítio ativo da enzima, a Thr89 e a Lys162 estão muito próximas, o que corrobora com a proposição deste mecanismo. Contudo, quando a glutamina está no sítio ativo, esta proximidade não ocorre, o que explicaria a menor atividade da enzima em relação à glutamina (ANISHKIN et al., 2015).

Em diversos trabalhos, ambas as atividades asparaginásica e glutaminásica da EcA II foram descritas como apresentando cinética michaeliana (BOREK et al., 2014; LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010; CAPPELLETTI et al., 2008; DERST; HENSELING; RÖHM, 2000). Contudo, os resultados recentes de Anishkin et al. (2015) mostraram que esta enzima é alostérica sigmoidal em relação à asparagina, apresentando coeficiente de Hill (n_H) de 1,5 ± 0,1, e michaeliana frente à glutamina, com n_H de 1,1 ± 0,1.

Conforme citado, a EcA II catalisa a hidrólise da L-asparagina à L-aspartato com alta afinidade pelo substrato (k_M ou $k_{0,5}$ na faixa de μM) e alta eficiência (k_{cat}/k_M ou $k_{cat}/k_{0,5}$ de 10^6 s^{-1} M^{-1}); já a catálise da L-glutamina à glutamato ocorre com baixa

afinidade ao substrato (k_M na faixa de mM) e baixa eficiência (k_{cat}/k_M de 10^3 s^{-1} M^{-1}) (ANISHKIN et al., 2015; DERST; HENSELING; RÖHM, 2000).

No plasma humano, há cerca de 50 µM de L-asparagina e 800 µM de L-glutamina (razão L-asparagina: L-glutamina cerca de 1:16); nesta situação, devido à alta especificidade à L-asparagina, 90% da EcA II recém injetada estará ocupada por este aminoácido. A clivagem da L-glutamina só será significante quando os níveis séricos de L-asparagina atingirem valores sub micromolares (< 0,4 µM, *i. e.*, com uma razão L-asparagina: L-glutamina < 1:2000), necessários para que haja a atividade antitumoral. Após clivagem de parte da L-glutamina, a razão entre os dois aminoácidos volta a ser favorável para a clivagem da L-asparagina (razão L-asparagina: L-glutamina > 1:2000); sendo assim, acredita-se que, no tratamento com a EcA II, a depleção de parte da L-glutamina do soro humano é necessária para que ocorra a depleção completa da L-asparagina (ANISHKIN et al., 2015). Segundo Anishkin et al. (2015), estes dados “explicam as mudanças correlacionadas nos níveis de L-asparagina e L-glutamina que foram registradas em estudos clínicos”.

Segundo Verma et al. (2014) e Mehta et al. (2014) o mecanismo de ação antitumoral das L-asparaginases não se resume apenas à depleção do aminoácido L-asparagina, mas estaria também associado à interferência nas vias de sinalização e à inibição da expressão de fatores de transcrição oncogênicos. Corroborando com esta ideia, em estudo com mutantes da L-asparaginase de *Rhodospirilum rubrum*, Pokrovskaya et al. (2015) verificaram que as atividades citotóxica e antineoplásica das enzimas estudadas não estavam relacionadas diretamente com as propriedades cinéticas destas.

2.1.2 Eventos Adversos

2.1.2.1 Hipersensibilidade e formação de anticorpos anti-L-asparaginase

Apesar da relativa baixa toxicidade da L-asparaginase, quando comparada a outros agentes antineoplásicos (BOREK et al., 2014), devido à origem bacteriana da enzima (MEHTA et al., 2014), entre 30 e 75% dos pacientes tratados com L-

asparaginase de *E. coli* apresentam hipersensibilidade e cerca de 70% desenvolvem anticorpos anti-L-asparaginase (FERNANDEZ et al., 2014).

A produção de anticorpos anti-L-asparaginase ocorre principalmente (cerca de 85%) na reexposição à L-asparaginase após um primeiro contato com a droga, *i. e.,* nos regimes intermitentes e nos regimes de pós-indução, sejam eles de intensificação ou reindução (FERNANDEZ et al., 2014; PIETERS et al., 2011; CHEN et al., 2010). Apesar dos anticorpos estarem associados aos sintomas clínicos de hipersensibilidade, alguns pacientes (cerca de 29%) desenvolvem anticorpos anti-L-asparaginase sem qualquer sintoma clínico – fenômeno que recebe o nome de inativação silenciosa ou hipersensibilidade subclínica (ASSELIN; RIZZARI, 2015). Neste cenário, os anticorpos produzidos geram resistência ao tratamento pela inativação das enzimas (PIETERS et al. 2011), redução da meia vida (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007), elevação da depuração renal, conduzindo, por fim, a níveis séricos subterapêuticos do medicamento (FERNANDEZ et al., 2014).

A incidência de hipersensibilidade à L-asparaginase é mais comum após o centésimo dia de tratamento, e a frequência desta reação está associada à preparação farmacêutica da enzima, ao esquema de tratamento – número e frequência de injeções – à administração conjunta de outros agentes quimioterápicos, ao imunofenótipo do tumor e a fatores genéticos do paciente (FERNANDEZ et al., 2014; CHEN et al., 2010). Geralmente as primeiras reações de hipersensibilidade são contra a EcA II, levando a substituição desta pela ErA; contudo, alguns pacientes são alérgicos às duas enzimas (CHEN et al., 2010).

Os sintomas das reações alérgicas à L-asparaginase incluem febre, dor, urticária, exantema, anafilaxia e desconforto respiratório, sendo que a maioria dos pacientes (84%) desenvolve reações alérgicas grau 2, enquanto que 15% destes desenvolvem grau 3, e apenas 0,5% grau 4 (CHEN et al., 2010).

Fatores associados ao paciente aumentam o risco do desenvolvimento de hipersensibilidade. No trabalho desenvolvido por Chen et al. (2010) através do estudo do genótipo de 485 crianças com LLA, foram identificados cinco polimorfismos únicos de nucleotídeo (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) presentes no gene *GRIA1*, localizado na região 5q33 do cromossomo 5, significantemente associados ao desenvolvimento da alergia à L-asparaginase. Esta região cromossômica (5q33) contém um conjunto de genes associados ao sistema imune, como os genes das interleucinas (IL)-4, IL-13 e IL-5 e

de citocinas, e tem sido associada às diversas doenças autoimunes e inflamatórias. Já o gene *GRIA1*, especificamente, codifica o receptor AMPA, responsável pela transmissão de sinais glutaminérgicos no cérebro – sendo o glutamato não apenas um neurotransmissor mas, também, um imunomodulador (CHEN et al., 2010).

Já foram identificados diversos epítopos na superfície da EcA II, responsáveis pela imunogenicidade – dentre eles a Asn55, Asp204, Asp255, Lys229 e Lys288 (MEHTA et al. 2014). Em estudo realizado por Werner, Röhm e Müller (2005), através de *phage display* e SPOT com IgG anti-EcA II de coelhos, a região identificada como mais imunogênica foi a compreendida entre a serina 252 e a alanina 258 (^{252}SVFDTLA^{258}). Já no estudo de Jianhua et al. (2006), através de ensaio de imunoabsorção enzimática de diversos mutantes da EcA II à anticorpos anti-EcA II de coelhos, provou-se que a sequencia ^{195}RKH^{197} é essencial para a imunogenicidade da enzima.

Em estudo mais recente, Fernandez et al. (2014) analisaram os alelos do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*) de classe II de 1.870 pacientes pediátricos com LLA. O HLA de classe II está envolvido na modulação da resposta imune, pois é nele que as células B ligam epítopos de antígenos, e os apresentam para as células T CD4$^+$, desencadeando a secreção de citocinas nestas células, e de anticorpos naquelas. Dentre os alelos avaliados por arranjos de genotipagem de SNPs, o alelo HLA-DRB1*07:01 foi identificado como associado aos maiores índices de hipersensibilidade e de anticorpos anti-L-asparaginase. Através de ferramentas de predição da ligação de epítopos, os pesquisadores verificaram que este mesmo alelo também possuía a maior afinidade de ligação aos epítopos da L-asparaginase, especialmente à região compreendida entre a prolina 212 e a alanina 230 desta enzima (^{212}PKVGIVYNYANASDLPAKA^{231}) sugerindo que esta região poderia ser a região mais imunogênica da enzima, e alvo de futuros estudos de melhoramento genético (FERNANDEZ et al., 2014).

2.1.2.2 Inativação por clivagem proteolítica

A hipersensibilidade e a resistência à L-asparaginase não estão apenas associadas à produção de anticorpos anti-L-asparaginase. Os pesquisadores Patel

et al. (2009) e Offman et al. (2011) sugerem que ambas hipersensibilidade e resistência por “inativação silenciosa” estejam associadas também à clivagem da L-asparaginase bacteriana pelas cisteíno-proteases humanas, como a asparagina endopeptidase (AEP) e a catepsina B (CTSB). Segundo estes autores, esta clivagem levaria à inativação da enzima circulante e à exposição de epítopos implicados na resposta imune dos pacientes.

A AEP, também conhecida por *legumain*, é codificada pelo gene LGMN, localizado no cromossomo 14q32.1 (STREFFORD, et al., 2005). Esta enzima é normalmente expressa pelos tecidos esplênico, hepático, renal e pelas células dendríticas, não sendo expressa em linfócitos ou linfoblastos saudáveis (PATEL et al., 2009). Porém, altas taxas de expressão desta enzima são detectadas nos linfoblastos tumorais, especialmente em pacientes de subtipos citogenéticos de alto risco, como os Philadelphia positivos (Ph+) e os pacientes com amplificação intracromossômica do 21 (iAMP21) (PATEL et al., 2009; STREFFORD, et al., 2005). Nos pacientes Ph+ ocorre a translocação de parte do cromossomo 9 para o cromossomo 22 (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015), enquanto nos pacientes iAMP21, ocorre o ganho de pelo menos três cópias de uma grande região do cromossomo 21 (MULLIGHAN, 2014). Ambos os subtipos citogenéticos (Ph+ e iAMP21) apresentam mal prognóstico e fraca resposta ao tratamento com L-asparaginase (PATEL et al., 2009; STREFFORD, et al., 2005).

A CTSB é codificada pelo gene de mesmo nome, localizado no cromossomo 8, região 8p22 (AGGARWAL; SLOANE, 2014). Ela é expressa constitutivamente em todos os tecidos, incluindo linfócitos e linfoblastos, e sua função normal é na renovação de proteínas (*turnover* protéico) que ocorre nos lisossomos; contudo, a expressão da CTSB é aumentada em diversos tumores, nos quais esta enzima está envolvida em processos de iniciação, proliferação, angiogênese e metástase (AGGARWAL; SLOANE, 2014; PATEL et al., 2009).

A susceptibilidade da EcA II à ambas AEP e CTSB foi demonstrada *in vitro* por Patel et al.(2009), através da incubação da EcA II com cada uma destas proteases puras e com lisados de diferentes tipos de linfoblastos pré-B. O teste com as proteases puras também foi realizado com a ErA e com a EcA II peguilada, e ambas foram sensíveis à clivagem pela CTSB e resistentes à clivagem pela AEP.

Estes resultados de Patel et al. (2009) ajudam a explicar a ampla variação na atividade L-asparaginásica do soro de crianças tratadas com a EcA II que não

apresentaram formação de anticorpos anti-L-asparaginase (SLUIS et al., 2013). Também embasam o relato recente de um paciente em tratamento para a LLA com a ErA, acometido por uma grave hiperamonemia, a qual foi associada à presença de uma rara deleção heterozigótica de códon único no gene codificador da CTSB, levando à síntese de uma CTSB defectiva, e a um aumento significativo no tempo de meia vida da ErA (MEER et al., 2014). A hiperamonemia é um efeito colateral à L-asparaginase, caracterizado por encefalopatia, podendo levar ao coma e à morte, sendo mais frequente no tratamento com a forma peguilada da EcA, devido à maior meia-vida desta (MEER et al., 2014; NUSSBAUM; LUBCKE; FINDLAY, 2016). De acordo com Meer et al. (2014) um dos motivos da forma peguilada da EcA possuir maior tempo de meia vida pode estar relacionado ao fato de que, aparentemente, a clivagem da L-asparaginase pela CTSB ocorra intracelularmente, após a remoção da L-asparaginase por células fagocíticas, o que não ocorreria com a forma peguilada.

2.1.2.3 Atividade glutaminásica

Segundo Borek et al. (2014) e Labrou, Papageorgiou e Avramis (2010), a atividade L-glutaminase está presente nas três L-asparaginases utilizadas atualmente no tratamento da LLA, sendo cerca de 2% e 10% da atividade L-asparaginase na EcA II e na ErA, respectivamente. A diferente especificidade das L-asparaginases pela asparagina ou pela glutamina pode estar associada às variações na conformação do *loop* flexível (LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010), ao grau de compactação do tetrâmero e ao tamanho da cavidade do sítio ativo (OFFMAN et al., 2011).

A glutamina é classificada como um aminoácido “condicionalmente essencial”, visto que é necessário em condições de estresse hipermetabólico (REINERT et al. 2006). Muitos dos eventos adversos causados pelo tratamento com a L-asparaginase, incluindo imunossupressão, pancreatites, danos hepáticos, hiperglicemia, anormalidades no sistema de coagulação sanguínea e, principalmente, neurotoxicidade, têm sido relacionados também à atividade L-glutaminase da enzima, motivando a busca por L-asparaginases, selvagens de

outros organismos ou engenheiradas, com reduzida atividade de L-glutaminase (CHAN et al., 2014; MEENA et al., 2015; MEHTA et al. 2014; SUDHIR et al., 2014; VERMA et al., 2014; OFFMAN et al., 2011; RAMYA et al., 2011; REINERT et al. 2006).

Dentre os estudos citados, Meena et al. (2015), Sudhir et al. (2014), Ramya et al. (2011) e Reinert et al. (2006) estudaram L-asparaginases de outros organismos, sendo eles, respectivamente, *Nocardiopsis alba*, *Bacillus licheniformis*, mutantes de *Pectobacterium carotovorum* e *Wolinella succinogenes*. Todas estas enzimas apresentaram atividade de L-glutaminase reduzida ou insignificante, mantendo, porém, atividade de L-asparaginase (MEENA et al., 2015; SUDHIR et al., 2014; RAMYA et al., 2011; REINERT et al. 2006). Já os pesquisadores Chain et. al. (2014), Mehta et al. (2014), Verna et al. (2014) e Offman et al. (2014) estudaram mutantes da EcA II com reduzida atividade glutaminásica, conforme descrito no item 2.1.3.

Apesar da atividade de L-glutaminase estar associada à toxicidade terapêutica, há controvérsias sobre os benefícios de uma L-asparaginase com menor atividade de L-glutaminase (CHAN et al. 2014; OFFMAN et al. 2011), tendo em vista que diversos autores alegam que atividade de L-glutaminase favoreceria a atividade antitumoral do medicamento (BOREK et al., 2014; PURWAHA et al., 2014; LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010; REINERT et al., 2006). Segundo estes autores, na ausência da atividade de L-glutaminase, a L-asparagina depletada poderia ser recuperada pela conversão do aminoácido L-glutamina em L-asparagina, através de um mecanismo de biossíntese *de novo*, catalisado pela enzima asparagina sintetase (BOREK et al., 2014; LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010; REINERT et al., 2006), a qual estaria super-expressa após a exposição dos pacientes à L-asparaginase (CHAN, et al., 2014; LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010).

Diante deste impasse, Chan et al. (2014), conforme melhor discutido no item 2.1.3, estudaram dois mutantes da EcA II com baixa atividade L-glutaminase, em diferentes tipos celulares tumorais. Através deste ensaio, esclareceram que a atividade de L-glutaminase é sim importante em tipos celulares capazes de expressar asparagina sintetase, como a MOLT-4 e a K562, porém, é desnecessária em células leucêmicas que não expressam esta enzima, tais como a Sup-B15 e a RS2. Sendo assim, segundo Chan et al. (2014), o desenvolvimento de uma enzima

L-asparaginase com baixa atividade de L-glutaminase se mantem justificado, uma vez que esta resultaria em uma enzima eficaz e de menor toxicidade aos pacientes portadores de tipos tumorais incapazes de expressar a asparagina sintetase. Contudo, um ano depois, conforme descrito em 2.1.1, o mesmo grupo mostrou que, devido à competição entre os dois substratos, é necessário que haja alguma depleção de L-glutamina para que ocorra a depleção completa da L-asparagina (ANISHKIN et al., 2015).

2.1.2.4 Outros Eventos Adversos

Outro evento adverso associado ao tratamento com a L-asparaginase é a hipertrigliceridemia. Segundo Hinson, Newbern e Linardic (2014), esta pode ser bastante expressiva, com níveis de triglicérides chegando a valores superiores a 9.000 mg/dL – cerca de 80 vezes o valor de referência, 110 mg/dL. Contudo, a hipertrigliceridemia é transiente, cessando com a interrupção do tratamento com L-asparaginase, e complicações, como trombose do seio sagital, pancreatite aguda, transaminemia e síndrome da hiperviscosidade, são raras (HINSON; NEWBERN; LINARDIC, 2014).

Além de serem complicações dos altos níveis de triglicérides, a pancreatite aguda e a trombose também estão relacionadas à homeostase do zinco. A descoberta recente de Borek et al. (2014) de uma região de ligação ao zinco na estrutura da L-asparaginase fornece indícios de que o zinco carreado pela enzima fornecida ao paciente poderia ser uma causa adicional destes eventos adversos, visto que afetaria o balanceamento entre a quantidade de zinco livre e ligada e a razão zinco/cobre do organismo. Considerando-se também que o zinco ligado à enzima diminui a atividade desta, uma versão mutante da enzima que seja incapaz de ligar zinco poderia melhorar o desempenho desta e diminuir os eventos adversos associados (BOREK et al., 2014)

2.1.3 Melhoramento da L-asparaginase por engenharia de proteínas

Diversos estudos de engenharia racional de proteínas têm sido realizados com o intuito de melhorar a atividade das L-asparaginases, reduzir a atividade de L-glutaminase e a atividade imunogênica da enzima, e aumentar a termoestabilidade e a estabilidade frente às proteases humanas (KOTZIA; LABROU, 2009; OFFMAN et al., 2011; RAMYA et al., 2011; VIDYA; USHASREE; PANDEY, 2014; CHAN et al., 2014; JIANHUA et al. 2006; MEHTA et al. 2014; VERMA et al. 2014).

No primeiro dentre estudos citados, Kotzia e Labrou (2009) estudaram o mutante D133V da ErA, o qual apresentou uma constante de inativação (Ki) pela temperatura 59 vezes menor do que a enzima selvagem. Através de estudos do potencial eletrostático da superfície na estrutura quaternária, os autores verificaram que o resíduo Asp133, carregado negativamente, está localizado em uma região neutra da enzima, e a sua substituição por um resíduo apolar, como a valina, poderia diminui as perturbações estruturais da molécula. Esta hipótese foi sustentada pela obtenção de mutantes D133L, D133I e D133T, nos quais os resíduos não carregados também aumentaram a termoestabilidade da enzima. Contudo, apesar da distância do resíduo 133 do sítio ativo, três dos quatro mutantes (D133V, D133L e D133I) apresentaram alterações na atividade da enzima, levando a valores de K_M maiores em relação à enzima selvagem, com exceção do mutante D133T, no qual a constante foi 1,5 vezes menor do que a enzima selvagem (KOTZIA; LABROU, 2009).

Outro estudo comprometido com a melhora da termoestabilidade das L-asparaginases foi realizado por Vidya, Ushasree e Pandey (2014). Neste estudo, a enzima selvagem modelo foi a EcA II, e também foram escolhidos dois resíduos da superfície da enzima: a Lys139 e a Lys207. Estes resíduos, carregados positivamente, foram substituídos por resíduos neutros (K139A e K207A), por resíduos com carga oposta (K139D e K207D) e por resíduos com a mesma carga (K139R e K207R). Semelhante aos resultados obtidos por Kotzia e Labrou (2009), os mutantes com resíduos não carregados (K139A e K207A) apresentaram a maior termoestabilidade, mantendo 65% e 57% de sua atividade após a incubação por 10 min a 60 °C, enquanto a enzima nativa manteve apenas 40% de atividade residual. A 70 °C, a enzima selvagem e os mutantes K139R e K207R perderam

completamente a sua atividade, enquanto os mutantes K139A, K207A, K139D e K207D mantiveram, respectivamente, cerca de 60%, 40%, 30% e 35% de atividade residual (VIDYA; USHASREE; PANDEY, 2014).

Já os autores Offman et al. (2011) verificaram que a substituição do resíduo de Asn24 na EcA II por resíduos de Ala ou Thr elevou consideravelmente a resistência à AEP e adicionalmente elevou a atividade L-asparaginásica da enzima. Através da combinação destas mutações no resíduo Asn24 com a substituição dos aminoácidos volumosos (Arg195 e Tyr250) existentes nas interfaces dos monômeros desta enzima por resíduos de menor volume (Ser e Leu, respectivamente), estes mesmos pesquisadores obtiveram mutantes com variáveis atividades L-asparaginase e L-glutaminase, possivelmente devido a alterações no grau de compactação entre os monômeros. A exemplo, o duplo mutante N24A/R195S teve a atividade de L-glutaminase reduzida em 50% e manteve a atividade de L-asparaginase e a citotoxicidade da enzima selvagem. Já o duplo mutante N24A/Y250L, perdeu completamente a atividade de L-glutaminase, cerca de 28% da atividade de L-asparaginase, e mostrou-se significantemente menos citotóxico em comparação com a enzima selvagem (OFFMAN, et al, 2011).

Em outro trabalho do mesmo ano, Ramya et al (2011) estudaram *in silico* mutações que ocasionassem alterações na energia de ligação ao substrato glutamina, e, consequentemente, na atividade de L-glutaminase. A enzima modelo para este estudo foi a L-asparaginase de *Pectobacterium carotovorum,* a qual apresenta energias de ligação aos aminoácidos asparagina e glutamina de -5,59 Kcal/mol e -8,08 Kcal/mol, respectivamente. Dentre os mutantes estudados, o D96A apresentou energias de ligação de -7,88 Kcal/mol e -5,97 Kcal/mol aos aminoácidos asparagina e glutamina, respectivamente, sugerindo um aumento de 40% na atividade de L-asparaginase e a uma diminuição de 30% na atividade de L-glutaminase (RAMYA et al., 2011).

Em estudo mais recente, Chan et al. (2014) realizaram a saturação de mutações (*saturation mutagenesis*) no resíduo Q59 da EcA II, identificado por simulações de dinâmica molecular como um resíduo promissor para ser alvo de uma mutação que diminuísse a atividade de L-glutaminase, mas que mantivesse a atividade de L-asparaginase. As atividades de L-glutaminase e de L-asparaginase foram quantificadas em todos os mutantes de Q59. Dentre eles, o Q59L e o Q59F apresentaram atividade de L-glutaminase ínfima, porém, mantiveram a atividade de

L-asparaginase: o Q59L manteve de 80% da atividade de L-asparaginase da enzima selvagem enquanto o Q59F manteve 25% desta atividade. Por apresentarem a menor razão glutaminase: asparaginase, estes mutantes (Q59L e Q59F) foram então escolhidos para os testes citotóxicos, realizados em oito tipos celulares leucêmicos (CCRF-CEM, SR, MOLT-4, K562, NALM-6, REH, Sup-B15 e RS4;11) e dois tipos celulares de câncer ovariano (OVCAR-8 e SK-OV-3). Através destes testes, os pesquisadores constataram que, conforme citado anteriormente, os mutantes sem atividade de L-glutaminase possuíam uma potente atividade anticâncer contra as células leucêmicas que não expressavam asparagina sintetase (a Sup-B15 e a RS2), porém, não eram efetivos nos outros tipos celulares testados, os quais são capazes de realizar a biossíntese *de novo* da L-asparagina a partir da L-glutamina (CHAN et al., 2014).

A respeito da diminuição da imunogenicidade da enzima, em 2006, Jianhua et al. desenvolveram diversos mutantes da EcA II, dentre eles o mutante R195A/K196A/H197A reduziu significantemente a imunogenicidade da enzima, sem afetar sua atividade L-asparaginásica.

Em dois trabalhos recém-publicados, pesquisadores obtiveram enzimas L-asparaginases mutantes, derivadas da EcA II, com maior atividade anti-leucêmica e menor imunogenicidade. Nestes trabalhos foram realizadas mutações sítio-dirigidas nos resíduos Tyr176 e Tyr181, presentes no *loop* que compõe grande parte da interface entre os dímeros “íntimos”, no resíduo Trp66, o único triptofano da enzima, e no resíduo Lys288, o qual é parte de um forte epítopo de célula B (VERNA et al., 2014; MEHTA et al., 2014).

Verna et al. (2014), através das mutações Y176F; Y176S e W66Y/Y176W, conseguiram aperfeiçoar a atividade da enzima, levando à uma constante $V_{máx}/K_M$ de 212 à 225 % da constante da enzima selvagem. Segundo Verna et al. (2014), os mutantes Y176F, Y176S e K288S/Y176F exibiram ainda atividade de L-glutaminase muito inferior à da enzima selvagem. Todos os mutantes estudados por Verna et al. (2014) possuíam dobramento normal, inferido pela alta similaridade entre os espectros de dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) dos mutantes e da enzima selvagem.

Mehta et al. (2014) realizaram diversos testes para avaliar as atividades citotóxicas e imunogênicas dos mutantes produzidos (Y176F, Y176S, K288S, K288R, W66Y, K288S/Y176F, K288R/Y176F). Em estudo com as células

leucêmicas, foi verificado que todos os mutantes, com exceção do Y176S, exibiram maior citotoxicidade (60 à 78%) em relação a enzima selvagem (48%). Destes mutantes, o duplo K288S/Y176F não ligou anticorpos produzidos contra a enzima selvagem e foi 10 vezes menos imunogênico em testes *in vivo* em camundongos, mesmo após sucessivas administrações da enzima. Já o mutante W66Y, em estudo com blastos leucêmicos obtidos de pacientes com LLA, induziu 4 vezes mais apoptose nestas células do que a enzima selvagem. Ainda, os mutantes Y176F, W66Y e K288S/Y176F diminuíram a expressão de enzima asparagina sintetase em células leucêmicas MV4:11 e mantiveram as células presas na fase G_0 mais efetivamente (63 à 72%) do que que a enzima selvagem (46%), sendo considerados substitutos promissores para a EcA II selvagem.

Na tabela 1 é apresentada uma relação das mutações dirigidas realizadas e dos melhoramentos obtidos através destas.

Tabela 1 – Resumo das mutações sítio-dirigidas realizadas com L-asparaginases de diferentes organismos e seus benefícios obtidos**.**

Referência	**Asparaginase Modelo**	**Mutantes**	**Melhoria Obtida**
KOTZIA; LABROU, 2009;	ErA	D133V, D133L, D133I e D133T	Aumento na termoestabilidade da enzima (diminuição da constante de inativação em até 59 vezes).
VIDYA; USHASREE; PANDEY, 2014	EcA II	K139A, K207A, K139D e K207D	Aumento na termoestabilidade da enzima (atividade residual 60%, 40%, 30% e 35%, respectivamente, após incubação por 10 min a 70°C).
OFFMAN et al., 2011	EcA II	N24A, N24T	Maior atividade e resistência da enzima às proteases humanas.
		N24A/R195S	Diminuição em 50% da atividade de L-glutaminase e manutenção da atividade asparaginásica. Atividade citotóxica mantida.
RAMYA et al., 2011	*P. carotovorum*	D96A	Alteração na energia de ligação ao substrato asparagina e glutamina.
CHAN et al., 2014	EcA II	Q59L e Q59F	Atividade de L-glutaminase quase indetectável, e potencial citotóxico mantido, apesar da redução na atividade asparaginásica (80% e 25% da atividade da enzima selvagem, respectivamente).
JIANHUA et al., 2006	EcA II	R195A/K196A/H197A	Menor imunogenicidade, atividade L-asparaginásica mantida.
VERNA et al., 2014	EcA II	Y176F; Y176S e W66Y/Y176W	Maior atividade, constante $V_{máx}/K_M$ de 212 a 225 % da constante da enzima selvagem.
MEHTA et al., 2014	EcA II	Y176F, Y176S e K288S/Y176F	Atividade de L-glutaminase muito inferior à da enzima selvagem
		Y176F, K288S, K288R, W66Y, K288S/Y176F, K288R/Y176F	Maior citotoxicidade (60 a 78%).
		K288S/Y176F	Menor imunogenicidade.
		W66Y	Induziu 4 vezes mais apoptose
		Y176F, W66Y e K288S/Y176F	Diminuíram a expressão de asparagina sintetase em células leucêmicas MV4:11

2.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PROPENSA A ERRO

A reação em cadeia da polimerase propensa a erro (epPCR – do *inglês error-prone polymerase chain reaction*) tem sido amplamente utilizada no melhoramento de enzimas com diferentes aplicações industriais. Segundo Labrou (2010) trata-se de um método para gerar mutagênese aleatória, a qual é “uma ferramenta poderosa para a obtenção de enzimas, proteínas, vias metabólicas ou até mesmo genomas inteiros com propriedades aprimoradas ou desejadas”. Em um estudo sobre métodos de mutagênese aleatória, Rasila et al. (2009) compararam métodos químicos e biológicos, e verificaram que a epPCR foi o método de maior eficiência e menos tendencioso, possuindo frequências de mutação controláveis pela quantidade do DNA alvo e/ou pelo número de ciclos

A epPCR é derivada da PCR normalmente utilizada para a rápida amplificação de sequências predefinidas de DNA *in vitro*. A diferença entre a PCR e a epPCR é que, enquanto a primeira tem por objetivo a obtenção de cópias fiéis da sequência de DNA amplificada, a segunda aproveita-se das taxas de erro intrínsecas da *Taq* DNA polimerase para a obtenção de uma biblioteca de genes com diferentes mutações. Estas taxas de erro podem ser moduladas alterando-se algumas condições da reação, como, por exemplo, adicionando manganês (Mn^{+2}) para reduzir a especificidade do pareamento das bases nucleotídicas, alterando a estequiometria dos desoxirribonucleotídeos (dNTPs) para favorecer a incorporação errônea dos nucleotídeos, e aumentando a concentração de magnésio (Mg^{+2}) para estabilizar pares de bases não complementares (LABROU, 2010, RASILA et al. 2009).

Diversos são os estudos que demonstram sucesso na obtenção de proteínas com propriedades otimizadas através da utilização do epPCR. Por exemplo, em 2006, foi conduzido um estudo na Alemanha cujo objetivo era obter enzimas que mantivessem sua atividade intrínseca mesmo após o encapsulamento em gel de poliacrilamida (PAA) – o qual é raramente utilizado em sistemas biocatalíticos, uma vez que causam detrimento significante na atividade das enzimas encapsuladas. Devido a sua importância em sínteses biocatalizadas, a enzima formato desidrogenase (FDH) de *Candida boidinni* foi escolhida como sistema modelo para

este estudo. O processo de epPCR, realizado em duas rodadas, foi capaz de originar uma enzima mutante cuja atividade residual após o encapsulamento em gel de PAA foi 440% maior do que a atividade residual da enzima selvagem, devido a mutações em resíduos de ácido glutâmico, lisina e cisteína, distantes do sítio ativo da enzima, que não afetaram a cinética da reação catalisada (ANSORGE-SCHUMACHER, 2006).

O epPCR também foi o método empregado por pesquisadores da Academia Chinesa de Ciência em Shangai, em 2009, para aprimorar a termoestabilidade da amidohidrolase N-carbamoil-D-aminoácido (DCase), uma enzima utilizada na produção de D-aminoácidos opticamente ativos, os quais são por sua vez empregados na síntese de antibióticos, pesticidas e hormônios peptídicos. Utilizando o epPCR com diferentes concentrações de $MgCl_2$ e $MnCl_2$, os pesquisadores obtiveram 12.000 colônias recombinantes produtoras de enzima mutante, das quais 25 produziram enzimas de maior termoestabilidade quando comparadas à enzima selvagem. Através do sequenciamento dos genes destes clones, identificaram-se nove mutações distintas, sendo que a mutação V237A foi a responsável pelo mutante mais termoestável, capaz de reter 50% da sua atividade após incubação a 65°C por 90 min – enquanto que a atividade da enzima selvagem foi quase completamente abolida após incubação por apenas 10 min nesta mesma temperatura (YU et al., 2009).

Um terceiro exemplo de estudo que obteve sucesso com emprego do epPCR foi conduzido na Universidade de Ciência e Tecnologia de Tianjin, China, no qual este método foi utilizado para melhorar a estabilidade em meio ácido da α-amilase de *Bacillus licheniformis.* Esta enzima é amplamente empregada em processos industriais que requerem a hidrólise do amido, como panificação, por exemplo. Porém, apesar da sua excelente termoestabilidade, a α-amilase tem sua aplicação limitada em função da perda da atividade hidrolítica quando o ambiente torna-se ácido. A partir de 5500 clones obtidos pelo método de epPCR, os pesquisadores selecionaram o mutante T353I/H400R, o qual apresentou maior atividade amilásica em pH 4.5, fortemente mantida após incubação a 90°C, quando comparada a atividade da α-amilase selvagem (LIU et al., 2012).

Contudo, o sucesso de uma epPCR depende das tendências de mutação da enzima polimerase utilizada, sendo ideal que ocorram transições (alterações entre

purinas ou entre pirimidinas) e transversões (alterações de uma purina para uma pirimidina) em proporções equivalentes (RASILA et al., 2009). Neste sentido, foi desenvolvida a DNA polimerase de baixa fidelidade *Mutazyme*, a qual produzia um conjunto mais homogêneo de mutantes, em comparação com outros procedimentos de epPCR (LABROU, 2010). Posteriormente, foi lançada a mistura enzimática *Mutazyme II DNA polymerase*, capaz de gerar uma biblioteca de mutantes de alta representatividade, uma vez que contêm duas DNA polimerases de tendências de mutação opostas: a *Mutazyme* DNA polimerase e um mutante da *Taq* DNA polimerase, com taxas de incorporação e extensão errôneas superiores às da *Taq* DNA polimerase selvagem (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014; LABROU, 2010).

Rasila et al. (2009) comprovaram que a preparação enzimática *Mutazyme II DNA polymerase* gera mutações menos tendenciosas do que outros métodos de mutagênese aleatória testados (epPCR por *Taq* DNA polimerase, cepa mutagênica XL1-Red e agente mutagênico cloridrato de hidroxilamina). Neste estudo, a epPCR pela *Mutazyme II* gerou uma razão transições *versus* transversões de 1,0 (quando variou-se a concentração de inserto) e 0,9 (quando variou-se o número de ciclos), enquanto, nos outros métodos, esta razão variou de 1,5 à 15,5. Em um cenário ideal, sem tendências, esta razão seria 0,5, uma vez que existem quatro tipos possíveis de transições (A:T para G:C e G:C para A:T) e oito tipos possíveis de transversões (A:T para T:A, G:C para C:G, A:T para C:G e G:C para T:A) (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014; RASILA et al. 2009).

Outras duas razões avaliadas por Rasila et al. (2009) foram (1) a razão entre as mutações de transição, de A:T para G:C *versus* G:C para A:T e (2) as mutações de A e T para qualquer nucleotídeo *versus* G e C para qualquer nucleotídeo. Em um cenário ideal, estas duas razões seriam iguais a 1,0. Os resultados destas razões para a *Mutazyme II* foram, respectivamente, 0,4 e 0,5 (quando se variou a concentração de inserto) e 0,7 e 1,2 (quando se variou o número de ciclos). Já estas razões para os outros métodos testados foram de 2,0 à 2,8 (epPCR pela *Taq* Polimerase), e de 0,3 à 0,0 (XL1-Red e cloridrato de hidroxilamina), mostrando, portanto, fortes tendências a tipos específicos de mutação. Por fim, além de transversões e transições, a *Mutazyme II* gerou cerca de 10% de inserções ou deleções de 1 pb (RASILA et al. 2009).

Segundo o fabricante da *Mutazyme II,* as frequências de mutação deste produto podem ser controladas simplesmente pela quantidade inicial do fragmento alvo da mutação e pelo número de ciclos de reação (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014). Rasila et al. (2009) também verificaram a frequência de mutações obtidas através destas duas variantes, obtendo um aumento de 10 a 40% nesta frequência através da variação na quantidade de DNA alvo de 100 à 0,001 ng (com 30 ciclos de epPCR), e de 2 à 11% através da variação do número de ciclos de epPCR de 1 à 20 (com 100 ng de DNA alvo).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Obtenção de L-asparaginase mutante com menor atividade L-glutaminásica e menor susceptibilidade à ação de proteases em relação à EcA II selvagem, sem perder a atividade L-asparaginásica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Construção dos padrões positivo (bactéria expressando a EcA II selvagem) e negativo (bactéria com o vetor de expressão vazio);
b) Produção de mutações randômicas por PCR propenso a erro;
c) Triagem dos clones produtores de L-asparaginases recombinantes ativas;
d) Sequenciamento genético dos clones recombinantes;
e) Caracterização das L-asparaginases mutantes purificadas quanto à atividade e cinéticas L-asparaginásica e L-glutaminásica;
f) Avaliação da resistência das L-asparaginases mutantes purificadas à atividade proteolítica da AEP e da CTSB;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE

Com intuito de verificar a qualidade e precisão dos métodos de análise a serem utilizados, realizou-se estes três métodos no medicamento Kidrolase® da *EUSA Pharma SAS*, o qual é composto pela enzima L-asparaginase de *E. coli*. Segundo informações da bula, este medicamento é composto por 10.000 UI de enzima e 48,6 mg de glicina, em pH entre 6,8 e 7,0 (KIDROLASE, 2014). Os métodos realizados foram a avaliação de pureza proteica por SDS-Page (descrito em 4.2.3.4), a quantificação da enzima por reagente de Bradford (descrito em 4.2.3.5), e a determinação da atividade L-asparaginase por reagente de Nessler (descrito em 4.2.3.6).

O medicamento foi inicialmente diluído em capela de fluxo laminar com 5 mL de água *milli-Q* estéril, volume este proposto na bula do medicamento. A partir desta solução foi realizada uma diluição 1: 10 (solução de trabalho 1) e 1: 20 da solução de trabalho 1 (solução de trabalho 2), ambas realizadas em fluxo laminar e com água *milli-Q* estéril.

A solução de trabalho 1 foi utilizada para a avaliação da concentração de enzima pelo método de Bradford (4.2.3.5). Para tal, foram realizadas diluições desta solução, e foram utilizadas amostras nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100% da solução de trabalho 1. A análise foi feita em triplicata para cada diluição. A concentração de proteínas também foi determinada nestas amostras pela absorbância a 280 nm, considerando-se o fator coeficiente de extinção molar da EcA II como 23.505 M^{-1} cm^{-1} (calculado usando a ferramenta *PROT PARAM* do site www.expasy.org), e foram também analisadas por SDS-Page (4.2.3.4), sendo aplicados 10 µL de amostra em cada poço.

Já a solução de trabalho 2 foi utilizada para a avaliação da atividade da enzima pelo método de Nessler (4.2.3.6). Também foram realizadas diluições desta solução, e foram utilizadas amostras nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50% da solução de trabalho 2 para o ensaio de atividade específica, realizado em triplicata com cada uma das concentrações. O ensaio de atividade foi realizado

conforme descrito em 4.2.3.6, utilizando-se o tampão Tris-HCl 50 mM com pH 8,8 e 8,6. O tempo de reação foi de 30 min.

Para verificar a estabilidade das amostras ao armazenamento em geladeira (4 a 8 °C), a quantificação da concentração de proteína pela absorbância a 280 nm e a determinação da atividade por Nessler foram repetidas 15 e 25 dias após a solubilização do liofilizado.

4.2 ESTABELECIMENTO DO PADRÃO DE L-ASPARAGINASE SELVAGEM

Conforme o desenho experimental apresentado no anexo A, o presente projeto requer a utilização de um padrão de asparaginase selvagem (controle positivo) para os valores da atividade e resistência à clivagem proteolítica da L-asparaginase II de *E. coli* selvagem (EcA II). Sendo assim, estabeleceu-se este controle positivo, assim como suas condições de cultivo, expressão e medida de atividade, conforme descrito abaixo.

4.2.1 Construção do padrão de L-asparaginase selvagem (controle positivo)

A construção do vetor de expressão do gene *ansB* selvagem foi realizada anteriormente a este projeto pela aluna de iniciação científica Mariana Silva Moreira Leite. O vetor utilizado foi o pET15b da *Novagen*, cujo mapa encontra-se no anexo B. Neste vetor foi inserido o gene *ansB* com sequência sinal, sintetizado pela empresa *GenScript*, com códons otimizados para a expressão de L-asparaginase II em *E. coli*, entre os sítios de clivagem das enzimas *NdeI* e *BamHI*. Esta construção (pET15b + gene *ansB*) foi transformada em *E. coli* DH5α, a qual trata-se de uma cepa ideal para a clonagem inicial e para a manutenção dos plasmídeos, visto que é *recA*-[1] e *endA*-[2], o que possibilita uma alta eficiência de transformação e uma

[1] O mutante *recA*- minimiza a recombinação do DNA plasmidial com o DNA do hospedeiro, aumentando a estabilidade dos insertos
[2] O gene *endA* codifica a endonucluease I, responsável pela clivagem de duplas fitas de DNA

produção e recuperação de plasmídeos otimizada (NOVAGEN, 2006). As cepas de *E. coli* DH5α contendo a construção pET15b + gene *ansB* foram criopreservadas em glicerol 10% a -80 °C.

Esta cepa criopreservada foi inoculada em meio LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de cloreto de sódio) e crescida por 16 h, a 37 °C e 180 rpm. Após o crescimento, foi realizada uma mini preparação plasmidial, conforme descrito no item 4.2.1.1, e os plasmídeos isolados foram então transformados, conforme procedimento descrito no item 4.2.1.2, em células de *E. coli* BL21(DE3) e em células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Esta última contém um plasmídeo com gene codificador para a proteína T7 lisozima, um inibidor natural da T7 RNA polimerase, o que aumenta a estabilidade da sequência alvo dos plasmídeos pET inseridos posteriormente nestas células (NOVAGEN, 2006).

4.2.1.1 Mini Preparação de Vetores Plasmidiais

As cepas de *E. coli* DH5α, transformadas com a construção pET15b + gene *ansB*, foram crescidas em meio LB adicionado de 0,1 mM carbenicilina, por 16 h, a 37 °C e 180 rpm. Após o crescimento, o plasmídeo foi obtido e purificado através do *kit* de mini preparação plasmidial *QIAprep*® da *Qiagen*, cuja metodologia é baseada na lise alcalina da célula bacteriana, seguida de adsorção do DNA em uma membrana de sílica, na presença de altas quantidades de sal (QIAGEN, 2012a) e do agente caotrópico hidrocloreto de guanidina, responsável pela adsorção do DNA à sílica da coluna (metodologia patenteada, QIAGEN, 2002). Os tampões utilizados nesta purificação estão descritos abaixo:

- **Tampão de ressuspensão P1**: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM; RNase 100 µg/ml, pH 8,0 (QIAGEN, 2012b);
- **Tampão de lise alcalina P2**: Hidróxido de sódio 200 mM, 1% SDS (p/v) (QIAGEN, 2012b);
- **Tampão de neutralização N3**: hidrocloreto de guanidina 4,2 M e acetato de potássio 0,9 M, pH 4,8 (QIAGEN, 2002)

- **Tampão de lavagem PE:** 80% etanol[3] (QIAGEN, 2002)
- **Tampão de eluição EB:** Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 (QIAGEN, 2012a).

O procedimento de purificação do plasmídeo foi realizado conforme a metodologia sugerida pelo fabricante (QIAGEN, 2012a), sumarizada abaixo:

- **1° Separação das células:** Centrifugação do inóculo por 60 s, 16.000 *g*; descarte do sobrenadante;
- **2° Lise alcalina das células:** Suspensão do pellet em 250 µL de tampão P1; adição de 250 µL de tampão P2 e inversão cuidadosa do tubo por 6 vezes;
- **3° Neutralização da suspensão e separação do DNA:** Adição de 350 µL de tampão N3 e inversão cuidadosa do tubo por 6 vezes; centrifugação por 10 min, 16.000 *g*;
- **4° Ligação do DNA:** Transferência do sobrenadante para a coluna de sílica *QIAprep*, disposta em um tubo coletor de 1,5 mL; centrifugação por 60 s, 16.000 *g*; descarte do líquido do tubo coletor;
- **5° Lavagem e secagem do DNA:** Lavagem da coluna com 750 µL de tampão PE; centrifugação por 60 s, 16.000 *g*; descarte do líquido do tubo coletor; repetição da centrifugação 60 s, 16.000 *g* para evaporação do etanol;
- **6° Eluição do DNA:** Transferência da coluna para um tubo de 1,5 mL limpo e livre de DNAse; adição de 50 µL de tampão EB, incubação por 60 s e centrifugação por 60 s, 16.000 *g*. O eluído conterá o DNA purificado.

4.2.1.2 Transformação das cepas de *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS

Após a obtenção dos vetores pET15b contendo o inserto *ansB,* estes foram transformados nas cepas de *E. coli* BL21(DE3) e *E. coli* BL21(DE3) pLysS. A transformação foi realizada através de eletroporação – um procedimento que leva à

[3] Composição exata não revelada pela patente. De acordo com o site *Research Gate*, esta seria: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, 80% etanol.

abertura de poros transitórios na membrana da bactéria, possibilitando a entrada do plasmídeo – conforme descrito a seguir:

- Adição de 1 µL da reação de ligação a 40 µL de *E. coli* DH5α eletrocompetente e incubação em gelo durante 1 minuto;
- Transferência da solução para uma cubeta de eletroporação, e encaixe desta no equipamento de eletroporação *Micro Pulser* da *Biorad*
- Eletroporação através de choque a 2,5 kV, por aproximadamente 4 ms.
- Ressuspensão das bactérias transformadas em 1 mL de meio LB, sem antibiótico, e crescimento durante 1 hora, à 37 °C e 180 rpm;
- Centrifugação do inóculo crescido a 16.000 *g* por 3 min;
- Ressuspensão do *pellet* formado em 100 µL de meio LB;
- Plaqueamento em meio LB sólido (mesma composição do LB adicionado de 20 g/L de ágar), contendo 0,1 mM de carbenicilina;
- Incubação da placa por 16 h a 37 °C. Devido à presença do antibiótico na placa, apenas as bactérias transformadas com o plasmídeo – o qual contém um gene de resistência a este antibiótico – irão formar colônias.

4.2.2 Construção do controle negativo

Plasmídeos pET15b vazios (pET15b Ø), isto é, sem o inserto do gene *ansB*, também encontravam-se criopreservados em cepas de *E. coli* DH5α e foram obtidos através de mini preparação plasmidial (conforme método descrito no item 4.2.1.1) e transformados em *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS, (conforme método descrito no item 4.2.1.2). Células assim transformadas foram submetidas aos mesmos ensaios realizados com as células contendo plasmídeos com inserto, e serviram como controle negativo para as avaliações realizadas.

4.2.3 Produção da enzima recombinante

4.2.3.1 Cultivo e indução

Após a transformação nos hospedeiros para expressão (descrita em 4.2.1.2), uma colônia crescida na placa de LB de cada transformação foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido, contendo 0,1 mM de carbenicilina. Estes pré-inóculos foram crescidos por 16 horas, a 37 °C, 180 rpm de agitação.

Após o crescimento, foi realizada uma diluição 1: 10 de cada pré-inóculo e foram lidas as densidades óticas destes a 600 nm (OD_{600}), em espectrofotômetro *Biophotometer Plus* da *Eppendorf*. Com base nestas leituras, foram preparados inóculos com OD_{600} inicial de 0,2 em frascos tipo *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 50 mL de meio LB, suplementado com 0,1 mM de carbenicilina. Estes inóculos foram crescidos a 37 °C e 180 rpm de agitação, até a fase log inicial, identificada pela OD_{600} de 0,6 à 0,8, quando, então, foi adicionado o indutor IPTG a 1 mM.

A indução com IPTG foi realizada a 37 °C e 180 rpm de agitação. Nas quatro construções realizadas (pET15b com inserto em BL21(DE3) e em BL21(DE3) pLysS e pET15b sem inserto em BL21(DE3) e em BL21(DE3) pLysS) foram testados dois tempos de indução distintos: 3 e 22 horas.

4.2.3.2 Obtenção e avaliação da enzima L-asparaginase

Após a indução, as amostras foram centrifugadas por 20 min, 4.000 *g*, 4 °C. Foram separados o sobrenadante (meio de cultura) e o *pellet* (células bacterianas) e ambos foram analisados quanto à presença da enzima EcA II, como descrito a seguir.

Os *pellets* das amostras produzidas em BL21(DE3), com e sem inserto, induzidos por 3 ou 22 horas, foram submetidos a um procedimento de choque osmótico, descrito em 4.2.3.3, para avaliação da presença da enzima EcA II no periplasma destas células. Os *pellets* de BL21(DE3) pLysS não foram submetidos ao

choque osmótico, uma vez que a lisozima T7 produzida por esta cepa cliva uma ligação específica na camada do peptideoglicano da parede destas células, fazendo com que a membrana interna se rompa e todo o citoplasma das células seja liberado no choque osmótico (NOVAGEN, 2006). Nas culturas de BL21(DE3)pLysS, a presença da L-asparaginase foi verificada apenas no *pellet* íntegro e no meio de cultura.

Os *pellets* íntegros (*i.e.,* antes do choque osmótico), sobrenadantes e frações periplasmáticas de todas as construções e tempos de indução foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio, SDS-Page (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) conforme descrito em 4.2.3.4.

Sobrenadantes e frações periplasmáticas foram também submetidos à quantificação de proteína total (método descrito em 4.2.3.5), à estimativa da concentração de L-asparaginase (método descrito em 4.2.3.5.1) e à determinação da atividade enzimática de L-asparaginase (método descrito em 4.2.3.6).

A tabela 2 apresenta os experimentos realizados com cada uma das construções e tempos de indução.

Tabela 2 – Análise da expressão solúvel de L-asparaginase

Cepa	**Tempo de indução**	**1**	**2**	**3**	**4**
E. coli BL21(DE3)	3 horas	X	$X^{P,S,F}$	$X^{S,F}$	$X^{S,F}$
	22 horas	X	$X^{P,S,F}$	$X^{S,F}$	$X^{S,F}$
E. coli BL21(DE3) pLysS	3 horas		$X^{P,S}$	X^{S}	X^{S}
	22 horas		$X^{P,S}$	X^{S}	X^{S}

Legenda: 1- Choque osmótico e obtenção do periplasma (item 4.2.3.3); **2**- Eletroforese em SDS-Page (item 4.2.3.4); **3**- Quantificação da concentração de proteína total (item 4.2.3.5) e estimativa da concentração de L-asparaginase (item 4.2.3.5.1); **4**- Determinação da atividade enzimática de L-asparaginase (item 4.2.3.6); **P** – *pellet* íntegro (*i. e.,* antes do choque osmótico); **S** – sobrenadante (meio de cultura); **F** – fração periplasmática.

4.2.3.3 Choque osmótico e obtenção da fração periplasmática

Após a centrifugação (descrita em 4.2.3.2), as células de *E. coli* BL21(DE3) foram submetidas ao choque osmótico descrito por Harms et al. (1991) e Boyd, Manoil e Beckwith (1987). O procedimento de choque osmótico consiste no tratamento inicial do *pellet* celular com 10 mL de tampão hiperosmótico (Tris-HCl 100

mM, pH 8,0; sacarose 500 mM; EDTA 0,5 mM) para cada 50 mL de cultivo, incubação no gelo por 5 min, e, posteriormente, centrifugação 20 min, 4.000 *g*, 4 °C. O *pellet* formado é então ressuspendido em 1,5 mL de fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) 0,5 mM para cada 50 mL de cultivo, seguida por incubação no gelo por 5 min – procedimento que leva ao rompimento da membrana externa da bactéria. Após uma terceira centrifugação nas mesmas condições, durante 40 min, o sobrenadante resultante é a fração periplasmática, e foi utilizado para a identificação da atividade de L-asparaginase (HARMS, et al., 1991; BOYD; MANOIL; BECKWITH, 1987).

4.2.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-Page)

Alíquotas das frações periplasmáticas obtidas em 4.2.3.3, dos *pellets* e dos sobrenadantes (meios de cultura) de todas as construções e tempos de indução foram avaliados através de SDS-Page.

O gel para a separação eletroforética foi preparado com 522 mM de Tris-HCl pH 8,8, 14% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,09% (p/v) de persulfato de amônio (PSA) e 0,19% (v/v) de tetrametiletilenodiamina (TEMED). Já o gel empacotador (aplicado sobre o gel de separação) foi preparado com 116 mM de Tris-HCl pH 6,8, 4% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,14% (p/v) de PSA e 0,29% (v/v) de TEMED.

As amostras foram preparadas conforme descrito abaixo:

- Amostras de sobrenadante (meio de cultura) e frações periplasmáticas: As amostras de sobrenadante e as frações periplasmáticas foram inicialmente quantificadas quanto à concentração de proteína total (método descrito em 4.2.3.5) e concentradas 1: 10 em *speed vacum Concentrator plus* da *Eppendorf.* Para cada 10 µg de proteína (volumes entre 20 e 30 µL) foram adicionados 0,5 µL DTT 1 M e volume suficiente de tampão de amostra 5 x para que este ficasse 1x na solução final. As amostras foram então desnaturadas em banho seco *Accu Block* ^{TM} (*Labnet International*) a 95 °C por 5 min.

- Amostras do *pellet:* As amostras de *pellet* foram inicialmente diluídas 1: 20. A uma alíquota de 10 µL desta diluição foi adicionado 5 µL de *Cracking Buffer* (60 mM de Tris-HCl pH 6,8; 10% de glicerol; 1% de SDS; 0,01% de bromofenol; 1% de β-mercaptoetanol). Estas amostras também foram desnaturadas em banho seco *Accu Block* ^{TM} (*Labnet International*) a 95 °C por 5 min.

O volume total das amostras preparadas foi aplicado no gel vertical. Paralelamente, foram aplicados 5 µL do padrão de massa molecular *BenchMark™ Protein Ladder* (*Invitrogen*) ou *Amersham ECL Rainbow* (*GE Healthcare Life Sciences)*. Foi utilizado para a corrida eletroforética o tampão Tris-Glicina-SDS (Tris-base 25 mM, glicina 189 mM e SDS 3,5 mM). A corrida foi realizada a 160 V, no equipamento *Mini Protean Tetra System* da *Biorad*.

Após a corrida, as proteínas foram coradas com azul *Coomassie G-250* em meio ácido (0,1% (p/v) de *Coomassie G-250*, 45% (v/v) de metanol, 10¨% (v/v) de ácido acético glacial em meio aquoso), por 20 min sob agitação. Após a coloração, o excesso de corante foi removido com solução descorante de metanol (10% v/v) e ácido acético (10% v/v) em meio aquoso.

4.2.3.5. Quantificação da concentração de proteína total

As amostras de sobrenadante (meio de cultura) e frações periplasmáticas de todas as construções (com ou sem o gene *ansB*) foram quantificadas, em triplicata, através do método de Bradford, o qual se baseia na coloração da enzima pelo corante azul brilhante de *Coomassie*. Este corante, quando livre e em pH ácido, possui absorção máxima a 470 e 650 nm; porém, quando ligado à proteínas, sua absorção máxima é em 595 nm (WILSON; WALKER, 2012b).

As amostras foram misturadas ao reagente de Bradford (*BioAgency* Laboratórios), na proporção de 20 µL de amostra para 1 mL de reagente, e foram incubadas durante 5 min a temperatura ambiente; as absorbâncias foram medidas a 595 nm em espectrofotômetro *Biophotometer Plus* da *Eppendorf*. A concentração de

proteína total foi obtida através da interpolação dos valores de absorbância em uma curva de calibração de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*), construída nas concentrações de 0,2 a 1,0 mg/mL (SIGMA-ALDRICH, 2013).

4.2.3.5.1 Estimativa da concentração de L-asparaginase nas amostras não purificadas

Além da quantificação de proteína total, foi também estimada a concentração de L-asparaginase nas amostras de meio de cultura e nas frações periplasmáticas das construções que continham o pET15b + gene *ansB*. Para isso, do valor de proteína total destas construções descontou-se o valor de proteína total do controle negativo (construções com pET15b Ø), o qual, teoricamente, possuia as mesmas proteínas das amostras positivas para L-asparaginase, com excessão desta enzima.

4.2.3.6 Determinação da atividade enzimática de L-asparaginase

A determinação da atividade enzimática de L-asparaginase nas amostras de sobrenadante (meio de cultura) e frações periplasmáticas foi realizada pelo método de Nessler. Este método quantifica a amônia liberada na hidrólise da L-asparagina à L-aspartato, reagindo-a com uma solução alcalina de tetra iodo mercurato de potássio ($K_2[HgI_4]$, reagente de Nessler), resultando em uma coloração amarela com absorbância a 440 nm. Uma unidade internacional de L-asparaginase (U) é definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 µmol de amônia por minuto, a 37 °C, sob saturação da concentração de substrato (MEHTA et al. 2014; VIDYA; USHASREE; PANDEY, 2014; KHUSHOO et al., 2004; KOTZIA; LABROU, 2009).

Realizou-se este método segundo adaptação do protocolo estabelecido pela *Sigma-Aldrich*, em microplacas de 96 poços. Em uma primeira etapa foram transferidos 16 µL da amostra (sobrenadante e fração periplasmática, em triplicata)

para uma placa contendo 9 mM de L-asparagina e 23 mM de tampão Tris-HCl pH 8,8, em 340 µL. Esta placa foi incubada a 37°C por 30 min, e então foram transferidos 34 µL desta reação para uma segunda placa, contendo 16 µL de ácido tricloroacético 1,5 M. A reação foi então diluída e foram adicionados 10% (v/v) do reagente de Nessler (*Merck Millipore*), completando o volume para 340 µL. A absorbância da coloração formada foi lida em espectrofotômetro de placas (*Spectra Max 384 Plus / Molecular Devices*) a 440 nm, considerando-se a absorbância dos controles negativos (pET15b Ø) como branco para as amostras. A concentração de amônia foi determinada através da interpolação de valores de absorbância resultantes em uma curva de calibração de sulfato de amônio, com concentrações de amônia de 10 a 100 mM (SIGMA-ALDRICH, 1997).

Foram calculadas a atividade enzimática em unidade internacional por mililitro de amostra (U/mL) e a atividade específica (U/mg), utilizando-se as concentrações de L-asparaginase estimadas anteriormente por Bradford (item 4.2.3.5.1).

4.2.3.7 Otimização da determinação da atividade enzimática de L-asparaginase

Com a fração periplasmática da construção pET15b em BL21(DE3) foram realizados testes adicionais para a otimização da determinação da atividade enzimática de L-asparaginase.

Inicialmente, a reação descrita no item 4.2.3.6 foi realizada variando-se o tempo de reação entre 10 e 30 min, parando-se a atividade enzimática das alíquotas a cada 5 min.

Posteriormente, a uma nova amostra foi adicionado 100 mM de glicina (concentração final), com o intuito de simular as condições do medicamento Kidrolase® (item 4.2). A reação de Nessler nesta amostra foi realizada conforme descrito em 4.2.3.6, com o melhor tempo de reação determinado anteriormente (10 min).

4.2.3.8 Otimização do cultivo e produção de L-asparaginase em microplacas de 96 poços

Diversos autores preocupam-se em estudar e validar condições de cultivo em microplacas, as quais têm sido extensamente utilizadas em biotecnologia (KENSY; ENGELBRECHT; BÜCHS, 2009; KENSY et al., 2009; DUETZ et al., 2000). Com base nestes trabalhos e em tutorial publicado pela revista *Genetic Engineering & Biotechnology News* (GEN, 2006), foram testadas para o cultivo as placas com volume final de 340 µL e 2 mL, com diferentes volumes de meio LB (170 µL na placa de 340 µL e 600, 750, 900, 1000 e 1100 µL na placa de 2 mL), sob agitação de 180 e 250 rpm (placa de 340 µL) e 250 rpm (placa de 2 mL). Nestes testes, foram inoculados poços com o controle positivo (cepas de *E. coli* BL21(DE3) transformada com pET15b com o gene *ansB* selvagem) e poços com o controle negativo (cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada com pET15b Ø), intercalados por poços contendo apenas meio LB limpo, de modo a possibilitar também, a verificação de uma possível contaminação cruzada entre os poços da microplaca devido a agitação. Durante a incubação, as microplacas foram envolvidas com papel umedecido com água destilada, de modo a diminuir a evaporação do meio de cultura.

No maior volume de meio LB em que houve crescimento bacteriano adequado (OD_{600} entre 0,6 à 0,8), foi realizada a indução (item 4.2.3.1) por 22 horas. Após este período, as microplacas foram centrifugadas por 20 min, 4.000 *g*, 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram submetidos ao choque osmótico (adaptado ao item 4.2.3.3), com 150 µL de tampão hiperosmótico na primeira etapa e 132 µL de solução aquosa de PMSF 0,5 mM na segunda etapa. Esta alteração dos volumes em relação ao item 4.2.3.3 foi necessária para a adequação ao volume da microplaca e ao volume necessário de amostra para os testes de quantificação de proteína total e de atividade.

A quantificação de proteína total dos extratos periplasmáticos foi realizada por método adaptado ao descrito no item 4.2.3.5, sendo utilizados os volumes de 10 µL de amostra em 250 µL do reagente de Bradford, diluído 5 vezes. A absorbância foi lida a 595 nm em espectrofotômetro de microplacas (*Spectra Max 384 Plus / Molecular Devices*), e os valores obtidos foram interpolados em uma curva de

calibração usando BSA nas concentrações de 0,1 à 0,5 mg/mL. Já a determinação da atividade da enzima foi realizada exatamente conforme descrito no item 4.2.3.6.

Nos ensaios em que as amostras foram crescidas em microplacas, não foi estimada a concentração de L-asparaginase (item 4.2.3.5.1), e a atividade foi calculada como unidades por miligrama de proteína total (U/mg total). Isto porque, devido à taxa de difusão de oxigênio variar consideravelmente conforme a posição dos poços na microplaca (DUETZ et al., 2000), o crescimento bacteriano não é homogêneo entre todos os poços, ocasionando grande heterogeneidade da concentração de proteínas produzidas, o que tornaria errôneo estimar a concentração de L-asparaginase pela simples subtração da concentração de proteína total do controle negativo (pET15b Ø).

4.3 PRODUÇÃO DA BIBLIOTECA DE POSSÍVEIS MUTANTES (CLONES)

Os procedimentos realizados para a obtenção da biblioteca de possíveis mutantes (nomeados nesta dissertação como “clones” até a confirmação da mutação por sequenciamento) estão descritos a seguir e sumarizados no esquema apresentado no anexo C.

4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase Propensa a Erro

A biblioteca de clones foi obtida através de reação em cadeia da polimerase propensa a erro (epPCR), utilizando-se o kit de mutagênese aleatória *GeneMorph II* da *Agilent Technologies*. Este kit contém a preparação enzimática *Mutazyme II DNA polymerase*, capaz de produzir uma grande diversidade de mutações, e que, conforme descrito no item 2.2, trata-se de uma mistura da enzima *Mutazyme* DNA polimerase e de um mutante da *Taq* DNA polimerase. Os outros componentes do kit para a reação de epPCR são o tampão de reação *Mutazyme II* (o qual contém

cloreto de magnésio) e uma mistura balanceada dos quatro dNTPs (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014).

Nesta reação foi utilizado como molde o padrão positivo (gene *ansB* selvagem clonado em pET15b). Conforme descrito no item 4.2.1, este gene foi sintetizado pela empresa *GenScript*, com códons otimizados para a expressão de L-asparaginase II em *E. coli*. Os plasmídeos pET15b contendo o gene *ansB* foram extraídos de cepas de *E. coli* DH5α através de mini preparação plasmidial, utilizando-se o *kit* QIAprep® da Qiagen, conforme descrito no item 4.2.1.1.

Após a extração, a concentração de plasmídeo foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) (0,4 g de agarose em 40 mL de tampão TAE: Tris-base 40 mM; ácido acético 20 mM, EDTA 0,05 mM, pH 8), adicionado de 1µM de brometo de etídio, o qual, ao se intercalar ao DNA, permite a visualização deste sob luz UV (WILSON; WALKER, 2012a). A eletroforese foi realizada a 85 V, com o gel horizontal submerso em tampão TAE 1X. Paralelamente às amostras, foram corridos dois padrões da *Invitrogen™ Thermo Scienfic*: (1) o padrão de massa molecular *1kb Plus DNA Ladder*, o qual possibilita a verificação do tamanho das bandas obtidas, e (2) o padrão de concentração *Low Mass DNA Ladder*, o qual permite estimar a concentração das amostras a partir da comparação entre a intensidade luminosa das bandas destas com a intensidade luminosa das bandas do padrão. A visualização das bandas das amostras e dos padrões foi realizada sob luz UV, e a imagem foi registrada com foto-documentador *Major Science UV DI.* A partir da concentração estimada do plasmídeo – a qual é relativa ao plasmídeo pET15b + gene *ansB*, com tamanho total de 6752 pb – calculou-se a concentração do DNA molde da epPCR – o gene *ansB*, com tamanho de 1044 pb.

Na epPCR foram utilizados os iniciadores 5’-GGGAATTCCATATGGAATTTTTC AAGAAGACCGCT-3’ (direto) e 5’-CGCGGATCCTCAGTATTGGTT-3’ (reverso), os quais possuem incorporados os sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *BamHI*, sublinhados nas sequencias apresentadas. Estes iniciadores foram desenhados com o auxílio do *software CLC Main Workbench* e da plataforma *IDT Oligo Analyser*. As temperaturas de anelamento Tm (do inglês *temperature of melting*) para os iniciadores direto e reverso foram 61,6°C e 57,1°C, respectivamente.

A epPCR foi realizada em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler – Applied Biosystems*. As concentrações de cada componente da reação e as condições do ciclo da epPCR foram aplicadas conforme sugerido pelo fabricante do kit *GeneMorph II*, e seguem sumarizadas nas tabelas 3 e 4 (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014).

Tabela 3 – Componentes e suas concentrações na epPCR realizada com o *kit GeneMorph II* ®

Componente	**Concentração Inicial**	**Volume Utilizado[3]**	**Concentração Final**
Tampão de reação	10 vezes	5 µL	1 vez
Mistura dos quatro dNTPs	10 mM de cada dNTP	1 µL	0,2 mM de cada dNTP
Primer forward	15 µM	1 µL	0,3 µM
Primer reverse	15 µM	1 µL	0,3 µM
DNA alvo[1]	15 ng/µL[2]	1 uL	0,3 ng/µL
Mutazyme II DNA polimerase	2,5 U/µL	1 uL	0,05 U/µL
Agua *milli-Q* esterilizada	N/A	40 µL	N/A

[1] Gene *ansB* com códons otimizados para expressão em *E. coli*, clonado em plasmídeo pET15b.
[2] Concentração referente ao DNA alvo (gene *ansB*), não ao plasmídeo pET15b. [3] Volume final 50 µL.
Legenda: N/A: não se aplica

Tabela 4 – Condições do ciclo da epPCR realizada com o kit *GeneMorph II* ®

Estágios e número de ciclos	**Temperatura**	**Tempo**
Estágio 1 (1 ciclo)		
Desnaturação inicial	95°C	2 min
Estágio 2 (20 ciclos)		
Desnaturação	95°C	30 s
Anelamento	57 °C	30 s
Extensão	72°C	1 min e 30 s
Estágio 3 (1 ciclo)		
Extensão final	72°C	10 min

Após a epPCR, o produto da reação foi purificado após separação por eletroforese em gel de agarose, utilizando-se o kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* da *GE Healthcare Life Sciences*, seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES, 2008), conforme descrito a seguir:

- **1° Separação do DNA**: Eletroforese a 85 V do produto da epPCR em gel de agarose à 1%.

- **2° Captura do DNA:** Visualização da banda de DNA sob luz UV, corte do gel de agarose ao redor da banda de DNA e imersão do fragmento cortado em 1 µL/mg de tampão de captura tipo 3, incubação à 60 °C durante aproximadamente 30 min;
- **3° Ligação do DNA:** Transferência da mistura de DNA e tampão de captura para a coluna *GFX Microspin*, incubação por 60 s e centrifugação por 30 s, a 16.000 *g*, descarte do sobrenadante. O DNA ficará ligado à coluna.
- **4° Lavagem e Secagem do DNA:** Adição do tampão de lavagem tipo 1, centrifugação por 30 s a 16.000 *g*. Transferência da coluna para um tubo limpo, livre de DNAse.
- **5° Eluição:** Adição do tampão de eluição tipo 4 (10 mM Tris-HCI, pH 8.0), incubação por 60 s, centrifugação por 60 s à 16.000 *g*, descarte da coluna. O eluído conterá o DNA purificado.

A pureza do produto obtido foi verificada em gel de agarose a 1%, conforme descrito anteriormente neste item.

4.3.2 Digestão do Produto de epPCR e do vetor de expressão pET15b

Após a purificação, o produto da epPCR e o pET15b foram digeridos, em tubos *eppendorf* separados, com as endonucleases de restrição *NdeI* e *BamHI High Fidelity (HF™)* da *New England Biolabs.* De acordo com o fabricante, as enzimas alta fidelidade HF™ possuem atividade *star* reduzida, a qual se trata da capacidade intrínseca das enzimas de restrição de clivar sequências semelhantes, mas não idênticas a sua sequência de reconhecimento definida. Esta atividade é favorecida quando as enzimas são submetidas a certas condições, como a concentração de glicerol acima de 5%, alta concentração de enzima, tempo prolongado de reação ou tampão inadequado (NEW ENGLAND BIOLABS, 2014).

A digestão de 41 µL de DNA purificado (não quantificado) foi realizada com 0,8 UI/µL de cada enzima de restrição (*NdeI* e *BamHI HF*, ambas da *New England Biolabs*) em Tampão *Cut Smart* (*New England Biolabs*) (Tris-Acetato 20 mM, Acetato

de Magnésio 10 mM, Acetato de Potássio 50 mM e BSA 100 µg/mL, em pH 7,9. (NEW ENGLAND BIOLABS, 2014). A digestão foi conduzida por 16 horas a 37°C.

Após a digestão, inserto e vetor foram purificados através do método descrito no item 4.3.1. Após a purificação, as concentrações das amostras foram estimadas por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 4.3.1.

4.3.3 Ligação do Produto de epPCR ao vetor de expressão pET15b

A reação de ligação do inserto (produto da epPCR digerido) ao vetor de expressão (pET15b) foi realizada através da enzima T4 DNA ligase (*Invitrogen*), durante 16 horas a 16°C. Nesta reação, a razão molar aproximada entre inserto e vetor foi de 3:1, sendo utilizados 3 ng/µL de inserto, 5 ng/µL de vetor e 0,1 U/µL de T4 DNA ligase (*Invitrogen*), em tampão de ligação (*Thermo Scientific*) (Tris-HCl 40 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0,5 mM, pH 7,8, THERMO SCIENTIFIC, 2012).

4.3.4 Transformação da bactéria *E. coli* BL21(DE3)

Após a reação de ligação, o vetor pET15b contendo o produto da epPCR foi transformado na cepa *E. coli* BL21 (DE3) por eletroporação, através de protocolo descrito no item 4.2.1.2. Doze alíquotas de 20 µL do meio crescido foram plaqueadas em 12 placas de meio LB sólido, contendo 0,1 mM de carbenicilina. As placas foram incubadas por 16h a 37°C.

4.3.5 Criopreservação da biblioteca de clones

Foram selecionadas 94 colônias isoladas de cada placa, que foi inoculada individualmente em uma microplaca de 96 poços de 340 µL, contendo 170 µL de meio LB líquido suplementado com 0,1 mM de carbenicilina, totalizando 12 microplacas. Os poços 1A e 1B de cada microplaca foram reservados para os controles positivo (cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada com pET15b com o gene *ansB*) e negativo (cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada com pET15b Ø), respectivamente.

Para efeito de identificação, a cada um dos clones foi designado um nome de quatro dígitos e uma letra, baseado na localização deste clone em cada placa, onde os dois primeiros dígitos referem-se ao número da placa (01 à 12), o terceiro e o quarto dígito referem-se ao número da coluna (01 à 12), e a letra refere-se a linha da placa (A à H).

Os inóculos foram crescidos *overnight*, a 37 °C, 220 rpm de agitação, amplitude de rotação de 1,9 cm. Após o crescimento, em cada poço foi adicionada solução aquosa de glicerol, de maneira a obter-se concentração final de 10% de glicerol. As placas foram então congeladas em freezer a -80 °C. Desta maneira obteve-se uma biblioteca com 1128 clones do gene *ansB.*

4.4 TRIAGEM DOS CLONES PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE ATIVA

Os procedimentos realizados para a triagem da biblioteca de clones estão descritos a seguir e sumarizados no esquema apresentado no anexo D.

4.4.1 Cultivo e Indução

A primeira etapa da triagem foi a reativação dos clones obtidos, armazenados no freezer -80 °C. Para tal, foi utilizado um carimbo replicador de 96 pinos (*Boekel Scientific*) o qual possibilita a transferência de pequenos volumes (~0,3 µL para pinos com diâmetro de 3 mm) de cada poço com meio congelado, sem descongelar o restante da cultura (DUETZ, et. al. 2000; GEN, 2006). O volume de cultura carreado no replicador foi transferido para uma microplaca de 96 poços de 340 µL, com fundo redondo, contendo em cada poço 170 µL de meio LB liquido, suplementado com 0,1 mM de carbenicilina.

O meio inoculado (pré-inóculo) foi crescido por 16 horas, a 37 °C, com agitação de 250 rpm. Após o crescimento, foi realizada uma diluição 1:10 em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, e, nesta, foi lida a OD_{600} do pré-inóculo em espectrofotômetro de placas (*Spectra Max M2 - Molecular Devices*). A partir deste pré-inóculo, por diluição em um novo meio de cultura, foram preparados inóculos com OD_{600} inicial média de 0,2.

Estes inóculos foram preparados em microplacas de 96 poços profundos de 2 mL, com fundo redondo, contendo em cada poço o volume final de 1,1 mL de meio LB liquido, suplementado com 0,1 mM de carbenicilina. Os inóculos foram mantidos nas mesmas condições descritas acima (37 °C, 250 rpm), por 1h40, invertendo-se a posição das placas após 50 min, para possibilitar um crescimento mais homogêneo. Após este período, foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada poço para a verificação da OD_{600}. Após confirmação da OD_{600} entre 0,5 e 0,8, em cada poço foi adicionado IPTG 1 mM. As placas foram então incubadas a 37 °C, 250 rpm, durante 22 horas.

4.4.2 Choque Osmótico, Atividade e Quantificação de Proteína Total

Após a indução com IPTG durante 22 horas, as placas foram centrifugadas por 20 min, 4.000 *g*, 4°C e o sobrenadante (meio de cultura) foi descartado.

Os *pellets* de células foram então submetidos a um procedimento de choque osmótico adaptado ao descrito no item 4.2.3.3, com base na otimização realizada no item 4.2.3.7. Inicialmente os *pellets* foram ressuspendidos em 150 µL de tampão hiperosmótico (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; sacarose 500 mM; EDTA 0,5 mM) gelado, e transferidos para microplacas de 96 poços de 340 µL e fundo redondo, para facilitar o manuseio. As placas foram então incubadas por 5 min no gelo e centrifugadas por 20 min, 4.000 *g*, 4 °C, com posterior descarte do sobrenadante. Os *pellets* desta segunda etapa foram ressuspendidos em 132 µL de solução aquosa gelada de 0,5 mM de PMSF, e as placas foram novamente incubadas no gelo por 5 min, e centrifugadas por 60 min, 4.000 *g*, 4 °C. Os sobrenadantes resultantes da última centrifugação foram então transferidos para uma nova placa de 96 poços de 340 µL e fundo redondo, e mantidos resfriados em gelo.

Para a realização do teste de atividade descrito no item 4.2.3.6, alíquotas dos sobrenadantes foram diluídas 2,5 vezes em PMSF 0,5 mM. O procedimento foi realizado conforme descrito no item citado, aplicando-se, porém, 15 min como tempo de reação, de modo a permitir tempo hábil para todas as pipetagens necessárias.

Neste teste, foi considerado como branco a absorbância obtida pela fração periplasmática do controle negativo, uma vez que neste não há a superexpressão da enzima L-asparaginase.

Nos clones em que a absorbância a 440 nm foi superior a 0,1 foi realizado também o ensaio de Bradford adaptado, conforme descrito no item 4.2.3.8, para verificar a concentração de proteína total. Conforme descrito no item citado, devido ao crescimento bacteriano – e, portanto, a quantidade de proteínas secretadas no periplasma – não ser homogêneo entre os poços da microplaca, para estas amostras não foi realizada a estimativa da concentração de L-asparaginase (item 4.2.3.5.1), sendo a atividade dos clones e do padrão positivo considerada como U/mg de proteína total (U/mg total).

4.4.3 Sequenciamento dos Clones

Os clones que apresentaram atividade (U/mg total) equivalente à atividade do padrão positivo foram selecionados para o sequenciamento. Para tal, foram inoculados em meio LB, e crescidos por 16 h, a 37 °C e 180 rpm. Após o crescimento, foi realizada a mini preparação plasmidial, conforme descrito no item 4.2.1.1. A concentração de plasmídeos purificados foi então estimada através de eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) contendo 1 µM de brometo de etídio, utilizando-se como padrão para esta estimativa o *Low Mass DNA Ladder* da *Invitrogen™ Thermo Scientific*, conforme descrito no item 4.3.1

Foi realizada a reação de sequenciamento baseada no método de Frederick Sanger, utilizando-se o *kit BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Applied Biosystems®* da *Thermo Scientific*. Para cada amostra, foram feitos dois tubos, um para o iniciador T7 direto (5' TTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTG 3') e outro para o iniciador T7 reverso (5' TGCTAGTTATTGCTCAGCGGTG 3'). Em cada tubo foram colocados 0,64 pmol/µL do iniciador, 3 µL de tampão de sequenciamento 5 vezes, 2 µL do mix *BigDye* v. 3.1, e cerca de 10 ng/µL de DNA molde, em um volume final de 15 µL. A reação foi conduzida em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler – Applied Biosystems*, com uma etapa de desnaturação inicial de 2 min a 96 °C, seguida por 35 ciclos de desnaturação (45 s, 96 °C), anelamento (30 s, 53 °C) e extensão (4 min, 60 °C), e uma etapa final de extensão por 4 min a 60 °C.

Após a reação de sequenciamento, foi realizada a precipitação do DNA, conforme descrito abaixo:

- Adição de 25 µL do *mix* de precipitação gelado (composto por 92% (v/v) de etanol absoluto, 4% (v/v) de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 4% (v/v) de glicogênio 1 mg/mL) aos 15 µL da reação de sequenciamento;
- Incubação em gelo por 15 min;
- Centrifugação a 4000 *g* por 20 min à temperatura ambiente
- Inversão da placa para descartar o sobrenadante, e pulso a 1000 *g* com a placa invertida para secá-la;
- Adição de 50 µL de etanol 70% (v/v) gelado (não *vortexar*);
- Centrifugação a 4000 *g* por 20 min à temperatura ambiente;

- Inversão da placa para descartar o sobrenadante, e pulso a 1000 *g* com a placa invertida para secá-la;
- Secagem por 1 hora em local protegido da luz ou por 1 min a 95 °C em termociclador aberto

As amostras precipitadas foram então encaminhadas para o Serviço de Sequenciamento de DNA do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O resultado do sequenciamento foi avaliado quanto às mutações obtidas, sendo, então, nomeados “mutantes” os clones que apresentaram mutações não silenciosas.

4.4.4 Análise *in silico* das Mutações Obtidas

As mutações não silenciosas obtidas foram avaliadas *in silico* em diferentes aspectos: sua localização na estrutura proteica, e sua possível interferência na atividade glutaminásica e nos sítios preditos para a CTSB e a AEP e a conservação evolutiva dos resíduos mutados.

A localização das mutações, assim como a possível interferência na atividade glutaminásica, foi avaliada manualmente na estrutura cristalográfica da EcA II selvagem, publicada no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB, ID 3ECA, SWAIN et al., 1993) visualizada pelo programa PyMOL (DELANO, 2002).

Para a predição dos sítios proteolíticos para a CTSB, utilizou-se o software *SitePrediction* (VERSPURTEN et al., 2009), enquanto os sítios proteolíticos para a AEP foram preditos por inspeção manual (verificação da criação ou substituição de resíduos de asparagina ou aspartato). Ambas as predições foram realizadas na EcA II selvagem e em todos os mutantes.

Já para a avaliação da conservação evolucitiva dos resíduos mutados, utilizou-se o software de procura por alinhamento local do Centro Nacional Americano para Informação Biotecnológica (NCBI Blast, do inglês *National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool,* disponível em http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/), através do qual foram alinhadas 62 sequências

proteicas (incluindo a EcA II selvagem) constantes no banco de dados *UniProtKB/Swiss-Prot*.

4.4.5 Confirmação da Equivalência das Atividades Asparaginásicas

Para a confirmação da equivalência de atividade asparaginásica entre os mutantes e a EcA II selvagem, estes, juntamente com o padrão negativo (pET15b Ø), foram cultivados em triplicata biológica, em 100 mL de meio LB líquido, contendo 0,1 mM de carbenicilina, e induzidos na fase log inicial com 1 mM de IPTG, por 22 horas a 37 ºC, conforme descrito em 4.2.3.1.

A fração periplasmática destes cultivos foi extraída por choque osmótico (item 4.2.3.3) e, nos extratos periplasmáticos, foi determinada a concentração proteica por Bradford (item 4.2.3.5) e confirmada a presença da L-asparaginase por SDS-Page (item 4.2.3.4).

Realizou-se a determinação da atividade asparaginásica pelo ensaio de Nessler (item 4.2.3.6), empregando-se até oito pontos de concentração proteica na reação, de 0,9 a 9 µg/mL, todos os pontos em triplicata. A análise de variância simples (ANOVA 1 fator) dos valores obtidos pelos mutantes em relação à EcA II selvagem foi realizada através do teste de comparação múltipla de Dunnett, utilizando-se o software *GraphPad Prism 5*.

4.4.6 Determinação da Porcentagem de Atividade Glutaminásica por Hidroxamato

Para a determinação da porcentagem de atividade glutaminásica, determinou-se a atividade asparaginásica e glutaminásica nos extratos periplasmáticos dos mutantes e dos padrões pelo método do hidroxamato, adaptado de Drainas, Kinghorn e Paterman (1977). Este método consiste na reação do aspartato ou do glutamato, liberados na hidrólise da asparagina ou da glutamina, com a hidroxalamina, formando os ácidos β-hidroxamato aspártico (AHA) e γ-hidroxamato

glutâmico (GHA), respectivamente. Ambas as etapas (clivagem de asparagina ou glutamina e síntese de AHA ou GHA) são catalisadas pela enzima asparaginase. A formação de AHA e GHA pode ser quantificada pela reação destes com cloreto férrico, formando os compostos AHA e GHA férricos, que possuem absorbância a 500 e 540 nm, respectivamente (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977; EHRMAN; CEDAR; SCHWARTZ, 1971; GROSSOWICZ et al., 1950).

O método foi realizado em microplacas de 96 poços. Os extratos periplasmáticos dos mutantes e do padrão positivo foram utilizados em sete concentrações protéicas na reação: de 2 a 22 µg/mL para a atividade asparaginásica e de 56 a 560 µg/mL para a atividade glutaminásica. O extrato periplasmático do controle negativo foi utilizado apenas na concentração máxima (22 µg/mL para atividade asparaginásica e 560 µg/mL para atividade glutaminásica).

Nos experimentos foram utilizadas as concentrações finais de 10 mM de asparagina ou glutamina e 100 mM de hidroxalamina, preparada através da neutralização de uma solução de cloridrato de hidroxamina com hidróxido de sódio. A reação foi conduzida tamponada com Tris HCl 30 mM pH 8,6, a 37 °C por 10 min, e parada com ácido tricloro acético a 82 mM (concentração final). As microplacas foram então centrifugadas a 4000 *g* por 5 min. 185 µL de sobrenadante foram transferidos para uma placa limpa, adicionados de cloreto férrico 47 mM em ácido clorídrico 51 mM (concentrações finais) e o volume completado com água mili-Q.

Os valores de absorbância dos compostos AHA e GHA férricos foram determinados, respectivamente, a 500 e 540 nm, em espectrofotômetro de placas (*Spectra Max 384 Plus - Molecular Devices*), considerando-se as absorbâncias dos controles negativos como branco para os controles positivos e os mutantes. Estes valores foram interpolados em curvas de calibração construídas com os padrões de AHA ou GHA (*Sigma*), após reação destes com cloreto férrico. A partir das curvas calculamos as atividades asparaginásica e glutaminásica em unidades por miligrama de proteína total, e a relação proporcional (atividade glutaminásica %) entre estas duas atividades. As diferenças da atividade glutaminásica em % entre os mutantes e o padrão foram avaliadas através do teste de comparação múltipla de Dunnett, utilizando-se o software *GraphPad Prism 5*.

4.5 PURIFICAÇÃO

Para a purificação, partiu-se de um volume de cultivo de 500 a 1000 mL, realizado em frascos erlenmeyer. Cultivo e indução seguiram método descrito em 4.2.3.1, sendo a indução realizada por 22 horas a 37 °C.

A primeira etapa da purificação foi o choque osmótico, descrito por Harms et al. (1991) e Boyd, Manoil e Beckwith (1987) (item 4.2.3.3). A segunda (troca aniônica) e terceira (exclusão molecular) etapas seguiram o proposto por Bahreini et al. (2014).

4.5.1 Cromatografia de Troca Aniônica

A segunda etapa da purificação foi a separação cromatográfica em coluna de troca aniônica fraca HiTrap™ DEAE FF de 5 mL (*GE Life Sciences*). Para tal, o extrato periplasmático, obtido na primeira etapa, foi centrifugado a 16.000 *g* por 20 min e o sobrenadante filtrado em membrana de 45 µm. Este foi então carregado à coluna a 1 mL/min, através de bomba peristáltica. A eluição foi realizada em equipamento de FPLC (*fast protein liquid chromatography*) *ÄKTA Purifier* (*GE Life Sciences*), em três passos:

1° Eluição isocrática com tampão A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8) em 5 volumes de coluna, 1 mL/min;
2° Gradiente linear de 0 a 100% de tampão B (Tris-HCl 50 mM com cloreto de sódio 500 mM, pH 8,8) em 10 volumes de coluna, 1 mL/min;
3° Eluição isocrática com tampão B, em 5 volumes de coluna, 1 mL/min

A eluição foi monitorada a 280 nm e frações de 2 mL foram coletadas de todos os picos. Aliquotas de 5 a 20 µL destas frações foram avaliadas através de SDS-Page, conforme descrito no item 4.2.3.4. As frações que apresentaram maiores

proporções de L-asparaginase foram reunidas e estabilizadas com glicina 100 mM (concentração final).

4.5.2 Cromatografia de Exclusão Molecular

A terceira etapa foi a separação cromatográfica por exclusão molecular em coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (*GE Life Sciences*) das frações reunidas e estabilizadas na etapa anterior. Estas foram concentradas em filtros *Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore)* e centrifugadas a 16.000 *g* por 5 min para limpeza da amostra. Aliquotas de 500 µL foram injetadas na coluna. A eluição foi realizada no FPLC ÄKTA *Purifier* (*GE Healthcare Life Sciences*), de maneira isocrática, com tampão Tris-HCl 50 mM e glicina 100 mM, pH 8,6, com fluxo entre 0,75 e 1 mL/min e monitorada a 280 nm.

Frações de 0,5 mL foram coletadas de todos os picos. Aliquotas de 5 a 20 µL destas frações foram avaliadas através de SDS-Page, conforme descrito no item 4.2.3.4. As frações que apresentaram L-asparaginase visualmente pura foram quantificadas pela sua absorbância a 280 nm, considerando-se o coeficiente de extinção molar da EcA II selvagem, 23.505 M^{-1} cm^{-1}. Estas frações foram utilizadas nos ensaios de caracterização enzimática e clivagem proteolítica.

4.5.2 Verificação da estrutura quartenária

A cromatografia de exclusão molecular também foi utilizada para verificar se a asparaginase padrão e as mutantes produzidas estavam na forma de tetrâmeros.

Para tal, inicialmente determinou-se o volume morto da coluna (v_o), através do padrão *blue dextran 2000* (*GE Healthcare Life Sciences*) o qual possui a massa molar de 2000 kDa e, por ser totalmente excluído dos poros da membrana, seu volume de eluição (v_e) é igual ao v_o da coluna. Foram injetados 0,5 mg deste padrão, em 500 µL. Em seguida, realizou-se a eluição simultânea de outros quatro padrões

de massa molar: 0,2 mg de ferritina (440 kDa), 1,5 mg de conalbumina (75 kDa), 1,5 mg de anidrase carbônica (29 kDa) e 1,5 mg de ribonuclease A (13,7 kDa), todos da *GE Healthcare Life Sciences*, injetados em um volume total de 500 µL. As duas eluições dos padrões foram realizadas nas mesmas condições das amostras: em FPLC ÄKTA *Purifier* (*GE Healthcare Life Sciences*), de maneira isocrática, com tampão Tris-HCl 50 mM e glicina 100 mM, pH 8,6, fluxo de 1 mL/min, e monitorada a 280 nm.

Calculou-se o constante de distribuição (K_{av}) de cada padrão, dada pela seguinte fórmula:

$$K_{av} = \frac{(v_e - v_o)}{(v_c - v_o)}$$

sendo v_c o volume geométrico da coluna, que é de 24 mL. Plotou-se uma curva do log da massa molar (log_{MM}) dos padrões pelo K_{av} calculado para cada um deles e a partir desta, calculou-se a massa molar dos picos obtidos na purificação das amostras de L-asparaginase (WILSON; WALKER, 2012c; GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES, 2006; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

4.6 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DOS MUTANTES OBTIDOS

Os mutantes purificados e o padrão positivo foram caracterizados quanto a sua atividade e cinética enzimáticas.

Para essa caracterização, determinou-se a atividade específica asparaginásica (U_{ASN}/mg) de cada mutante e do padrão pelo método de Nessler (item 4.2.3.6), em 7 concentrações (20 à 200 nM) e 8 tempos distintos (2 à 16 min), e pelo ensaio acoplado à glutamato desidrogenase, detalhado abaixo (item 4.6.1). Já a atividade específica glutaminásica (U_{GLN}/mg), e os parâmetros cinéticos para atividade asparaginásica e glutaminásica ($V_{máx}$, K_M, e K_{cat}) foram determinados apenas pelo ensaio acoplado à glutamato desidrogenase.

4.6.1 Ensaio Acoplado à Glutamato Desidrogenase

O ensaio acoplado à glutamato desidrogenase mede a oxidação do NADH à NAD^+ pela glutamato desidrogenase (GDH), do qual é cofator. A GDH oxida uma molécula de NADH para a síntese de cada molécula de glutamato, a partir de uma molécula de α-cetoglutarato e uma molécula de amônia. No ensaio acoplado, a molécula de amônia provém da hidrólise da asparagina ou da glutamina pela L-asparaginase (BALCÃO et al. 2001; NELSON; COX, 2011a).

Os ensaios acoplados à glutamato desidogenase foram realizados conforme adaptação de Costa (2015) ao protocolo sugerido por Balcão et al. (2001) em placas de 96 micropoços.

Nos quatro ensaios realizados para cada mutante e para o padrão positivo (atividades específicas asparaginásica e glutaminásica e cinéticas asparaginásica e glutaminásica) utilizou-se 400 mU de GDH de soro bovino, 1 mM de α-cetoglutarato e 131 µM de β-NADH (os três da *Sigma Aldrich*). Todos os ensaios foram realizados tamponados com Tris-HCl pH 8,0 a 50 mM, em triplicata ou sextoplicata.

Para determinação da atividade específica asparaginásica empregou-se 20 mM de asparagina e seis concentraçoes de L-asparaginase, entre 1 e 6 nM. Já para a determinação da atividade específica glutaminásica, empregou-se 40 mM de glutamina e seis concentrações de L-asparaginase, entre 100 e 600 nM.

Na cinética asparaginásica, variou-se a concentração de asparagina de 10 a 2000 µM, com um total de 24 pontos, enquanto a enzima asparaginase foi utilizada a 20 nM. Já na cinética glutaminásica, variou-se a concentração de glutamina de 0,5 a 30 mM, com um total de 14 pontos, e a enzima asparaginase foi utilizada entre 400 e 1000 nM .

A oxidação do NADH (*i.e.*, sua extinção) foi monitorada em tempo real em espectrofotômetro de placas (*Spectra Max M2 - Molecular Devices*), a 340 nm, considerando-se como coeficiente de extinção molar do NADH o valor de 2,133 nmol/µL, estabelecido por Balcão et al. (2001) para as condições desse ensaio. De todos os pontos dos quatro ensaios foi descontada a desaminação espontânea da L-asparagina ou da L-glutamina através de micropoços “controle”, os quais continham todos os componentes da reação com exceção da enzima L-asparaginase.

Através do software *GraphPad Prisma 5* comparou-se a adequabilidade de dois modelos matemáticos aos dados experimentais das cinéticas asparaginásica e glutaminásica: o modelo de Michaelis-Menten (hipótese nula, $p < 0,0001$) descrito por uma curva hiperbólica, e o modelo alostérico, descrito por uma curva sigmoidal.

Foram calculados os parâmetros cinéticos velocidade máxima ($V_{máx}$), número de renovação (k_{cat}), constante de Michaelis-Menten (k_M) ou seu equivalente nos modelos alostéricos ($k_{0,5}$), constante de especificidade (k_{cat}/k_M ou $k_{cat}/k_{0,5}$) e coeficiente de Hill (n_H). Este último descreve o grau de cooperatividade entre uma subunidade enzimática e um dado substrato. Em enzimas michaelianas, onde não há cooperatividade, n_H é igual a 1,0; já nas enzimas alostéricas, este pode ser menor do que 1,0 (cooperatividade negativa) ou maior do que 1,0 (cooperatividade positiva). (WILSON; WALKER 2012d; NELSON; COX, 2011b).

Estes parâmetros cinéticos estão relacionados pelas fórmulas abaixo:

$$V_0 = \frac{V_{máx}\,[S]^{n_H}}{k_{0,5}^{n_H} + [S]^{n_H}}$$

$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E]}$$

onde V_0 é a velocidade inicial da reação enzimática; [S] é a concentração de substrato e [E] é a concentração enzimática (ANISHKIN et al 2015; KARAMITROS; KONRAD, 2014; NELSON; COX, 2011b)

4.7 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À CLIVAGEM PROTEOLÍTICA

A avaliação da resistência à clivagem proteolítica pela AEP e pela CTSB foi realizada através de adaptação do protocolo proposto por Patel et al. (2009). Incubou-se 4 µg de L-asparaginase com 2 µg de AEP ou 2 µg de CTSB (ambas humanas, recombinantes, produzidas em células HEK, pela empresa *Abcam*), em 20

µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,8, à 37 ºC por 120 horas. Após a incubação, realizou-se avaliação das bandas por eleltroforese em SDS-Page (item 4.2.3.4).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE UTILIZADOS

A avaliação / validação dos métodos de análise utilizados foi realizada com o medicamento Kidrolase®, conforme descrito em 4.1.

Os resultados brutos da quantificação de proteínas por Bradford e pela absorbância a 280 nm estão apresentados nas tabelas 5 e 6, respectivamente, e demonstraram que ambos apresentam resultados bastante semelhantes para a enzima L-asparaginase (36,58 mg/5mL e 34,94 mg/5mL, respectivamente). Devido à análise a 280 nm ser mais precisa para proteínas puras, para o cálculo da atividade específica da enzima, foi utilizada a concentração de proteína obtida por esse método (34,94 mg/5mL).

Tabela 5 – Resultado da quantificação da concentração da L-asparaginase no medicamento Kidrolase® pelo método de Bradford.

% da solução de trabalho 1	**Absorbância a 595 nm**	**Concentração na solução de trabalho 1 (mg/mL)**	**Quantidade total de proteína (mg/5mL)[2]**
20%[1]	0,108	Não considerado	Não considerado
40%	0,210	0,683	34,16
60%	0,296	0,739	36,95
80%	0,372	0,745	37,23
100%	0,454	0,760	37,99
média		**0,732**	**36,58**

[1]Devido à baixa concentração de proteínas neste ensaio, a leitura da absorbância desta amostra não é confiável, e não foi considerado no cálculo da média. [2] 5 mL foi o volume de dissolução do medicamento, conforme sugerido em bula (KIDROLASE, 2014).

Tabela 6 – Resultado da quantificação da concentração da L-asparaginase no medicamento Kidrolase® pela absorbância da enzima em 280 nm.

% da solução de trabalho 1	Absorbância a 280 nm	Concentração na amostra (μM)	Concentração na solução de trabalho 1 (μM)	Quantidade total de proteína (mg/5mL)[2]
20%[1]	0,081	Não considerado	Não considerado	Não considerado
40%	0,190	8,083	20,208	34,35
60%	0,289	12,295	20,492	34,84
80%	0,390	16,592	20,740	35,26
100%	0,488	20,762	20,762	35,30
média			**20,551**	**34,94**

[1]Devido à baixa concentração de proteínas neste ensaio, a leitura da absorbância desta amostra não é confiável, e não foi considerado no cálculo da média. [2] 5 mL foi o volume de dissolução do medicamento, conforme sugerido em bula (KIDROLASE, 2014).

Quanto à avaliação por SDS-Page, esta revelou bandas em todas as concentrações testadas (0,7 μg, 2,7 μg, 4,4 μg, 6,0 μg e 7,6 μg), como pode ser verificado na figura 1, indicando que, pelo menos a partir de 0,7 μg de L-asparaginase, a banda já é visível neste método. Além disso, podemos observar o alto grau de pureza do medicamento.

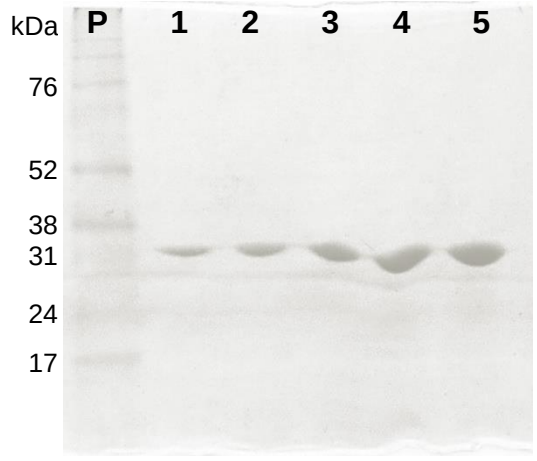


Figura 1 – Resultado da eletroforese em SDS-Page do medicamento Kidrolase®. Á esquerda, escala do padrão de peso molecular *Amersham ECL Rainbow.* Á direita, foto do gel de SDS, onde **(P)** refere-se ao padrão de massa molecular *Amersham ECL Rainbow* e as coluna 1 à 5 referem-se a diferentes quantidades de proteína aplicada no gel, sendo **(1)** 0,7μg; **(2)** 2,7 μg; **(3)** 4,4 μg; **(4)** 6,0 μg; **(5)** 7,6 μg.

Os ensaios de atividade, por sua vez, também comprovaram a eficiência do método testado, em Tris-HCl 50 mM em ambos os pH 8,8 e pH 8,6. A partir da

avaliação de várias concentrações diferentes de L-asparaginase, o resultado de atividade absoluta (UI) foi bastante próximo (8.933 UI no pH 8,6 e 9.091UI no pH 8,8) ao descrito em bula (10.000 UI) (KIDROLASE, 2014). Já o valor de atividade específica (UI/mg) ficou dentro do descrito na literatura para a L-asparaginase (280 a 400 UI/mg) (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007), sendo 256 UI/mg e 260 UI/mg, nos tampões de pH 8,8 e 8,6, respectivamente.

Contudo, conforme se pode notar nos dados brutos exibidos na tabela 7, para que as leituras sejam confiáveis e não ultrapassem 1,0 de absorbância, a concentração de asparaginase na reação deve estar entre $4{,}8 \cdot 10^{-3}$ e $14{,}5 \cdot 10^{-3}$ µM, concentrações estas provindas das soluções a 10, 20 e 30% da solução de trabalho 2, as quais foram utilizadas no cálculo da média das atividades absoluta e específica. O método de Nessler para avaliar a atividade da L-asparaginase é, portanto, bastante sensível.

Tabela 7 – Resultado da determinação das atividades absoluta (UI) e específica (UI/mg) em 5 mL do medicamento preparado Kidrolase®

% da solução de trabalho 2	**Concentração de enzima na reação (10^{-3} µM)**	**Absorbância a 440 nm (média da triplicata)**	**Atividade Absoluta (UI/5mL)[2]**	**Atividade Específica (UI/mg)[3]**
1%	0,4835	0,0324	31.264	895
5%	2,4177	0,1332	12.417	355
10%	4,8354	0,2356	9.338	267
20%	**9,6709**	**0,5025**	**8.752**	**250**
30%	**14,5063**	**0,7848**	**8.711**	**249**
40%	**19,3417**	**1,0826**	**8.810**	**252**
50%	24,1772	1,4505	9.298	266
Média[1]			**8.933**	**256**

[1]Conforme justificado no texto, para o cálculo da média das atividades absoluta e específica foram utilizados os valores obtidos pelas amostras de 10, 20 e 30% da solução de trabalho 2 (destacados em negrito), as quais levaram a valores confiáveis de absorbância. [2] 5 mL foi o volume de dissolução do medicamento, conforme sugerido em bula (KIDROLASE, 2014). [3] Foi considerada a concentração de proteína obtida pela quantificação sob luz UV a 280 nm (34,94 mg/5mL)

No ensaio de estabilidade da amostra ao armazenamento refrigerado, a enzima se mostrou relativamente estável após 15 e 25 dias da diluição, apresentando uma redução de 19% na atividade absoluta após 15 dias da diluição (7.211 ± 235 UI/5mL), a qual se manteve estável por mais 10 dias (7.526 ± 358 UI/5mL), considerando-se o desvio padrão entre as amostras lidas. Houve também uma pequena variação na quantificação da concentração da proteína, a qual foi

28,86 e 37,32 mg/5mL (-18 e +7%), após 15 e 25 dias, respectivamente, provavelmente devido a eventos de precipitação e variações do equipamento. Por fim, a atividade específica foi 100% estável após 15 dias (250 ± 8 UI/mg), apresentando, porém, variação de 21% após 25 dias de armazenamento (202 ± 10 UI/mg). Os valores estão descritos na tabela 8.

Tabela 8 – Resultado da quantificação de proteína (mg/5mL) e da determinação das atividades absoluta (UI/5mL) e específica (UI/mg) após 15 e 25 dias da diluição do medicamento Kidrolase®

Parâmetro	**Medicamento Recém Diluído**	**15 dias após a diluição**	**25 dias após a diluição**
Quantidade de Proteína Total (mg/5mL)[1]	34,94 ± 0,44	28,86	37,32
Atividade Absoluta (UI/5mL)[1]	8.934± 351	7.211 ± 235	7.526 ± 358
Atividade Específica (UI/mg)	256 ± 10	250 ± 8	202 ± 10

[1] 5 mL foi o volume de dissolução do medicamento, conforme sugerido em bula (KIDROLASE, 2014)

5.2 ESTABELECIMENTO DO PADRÃO DE L-ASPARAGINASE SELVAGEM

Devido à necessidade de se ter um controle positivo e negativo da produção e atividade da L-asparaginase, o primeiro passo deste projeto foi estabelecimento destes controles, assim como suas condições de cultivo, expressão e medida de atividade.

A construção do vetor do controle positivo (gene *ansB* com sequencia sinal nativa em pET15b) já havia sido realizada pelo grupo e já estava disponível em nosso laboratório. Já o vetor do controle negativo trata-se apenas do pET15b fechado, comercialmente disponível pela *Novagen*.

Com intuito de avaliar o melhor hospedeiro para expressão da L-asparaginase, duas cepas de *E. coli* distintas, BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS, foram transformadas com os vetores dos controles positivo e negativo. Em todas as construções, testaram-se também dois tempos de indução: 3 horas – padrão do nosso laboratório - e 22 horas – baseando-se no trabalho de Khushoo et al. (2004), o qual obteve os melhores resultados na expressão de L-asparaginase com 24 horas de indução. Através de SDS-Page dos *pellets* e meios de cultura de ambos os hospedeiros de expressão e das frações periplasmáticas de BL21(DE3), verificou-se que a L-asparaginase estava parcialmente expressa no *pellet* e meio de cultura,

estando em maiores concentrações na fração periplasmática da construção em BL21(DE3), conforme demonstrado na figura 2.

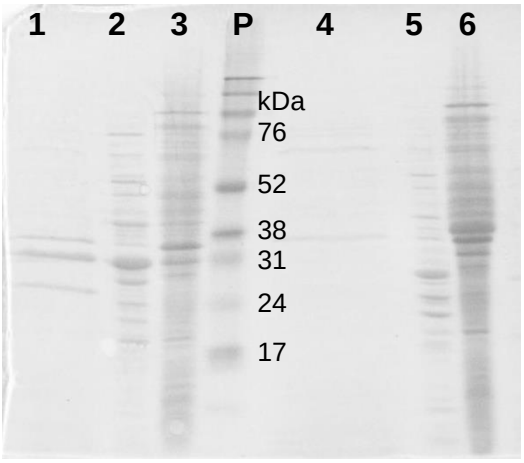


Figura 2 – Resultado da eletroforese em SDS-Page de amostras obtidas após expressão pelas cepas de *E. coli* BL21(DE3). À direita, escala do padrão de massa molecular *Amersham ECL Rainbow* (*GE Healthcare Life Sciences*). À esquerda, foto do gel de poliacrilamida das amostras do controle positivo (construção pET15b com o gene ansB) sendo coluna **(1)** meio de cultura, **(2)** periplasma e **(3)** *pellet*, das amostras do controle negativo (pET 15b Ø), sendo coluna **(4)** meio de cultura, **(5)** periplasma e **(6)** *pellet*. A região aproximada da banda da L-asparaginase (34 kDa), identificada pelo padrão de massa molecular *Amersham ECL Rainbow* **(P),** está realçada com o retângulo de bordas pretas sobre a foto. A L-asparaginase pode ser visualizada principalmente nas colunas 1, 2 e 3 (construção pET15b com o gene *ansB*). Nesta região pode ser visualizada também uma banda na coluna referente ao *pellet* do padrão negativo (coluna 6), possivelmente devido a alguma proteína expressa pela célula com tamanho similar à L-asparaginase. Neste experimento, em cada poço do gel foram aplicados cerca de 10 µg de proteína total. Todas estas amostras provieram da indução por 22 horas.

Este resultado foi confirmado através da medida da atividade de L-asparaginase, realizada pelo método de Nessler, diretamente no meio de cultura ou na fração periplasmática, sem qualquer procedimento de purificação, visto que, apesar da construção do vetor positivo possuir cauda de histidina na posição N-terminal, esta cauda está ligada à sequência sinal nativa da enzima L-asparaginase, e permanece no interior da célula quando a enzima madura é exportada para o periplasma. Os resultados de atividade (U/mL) obtidos estão apresentados no gráfico 1, o qual evidencia uma atividade expressiva de L-asparaginase (19,58 U/mL e 33,54 U/mL) apenas no periplasma das células de *E. coli* BL21(DE3), nos tempos de indução de 3 e de 22h, respectivamente, sendo, neste último, a atividade cerca de 70% superior em relação ao primeiro.

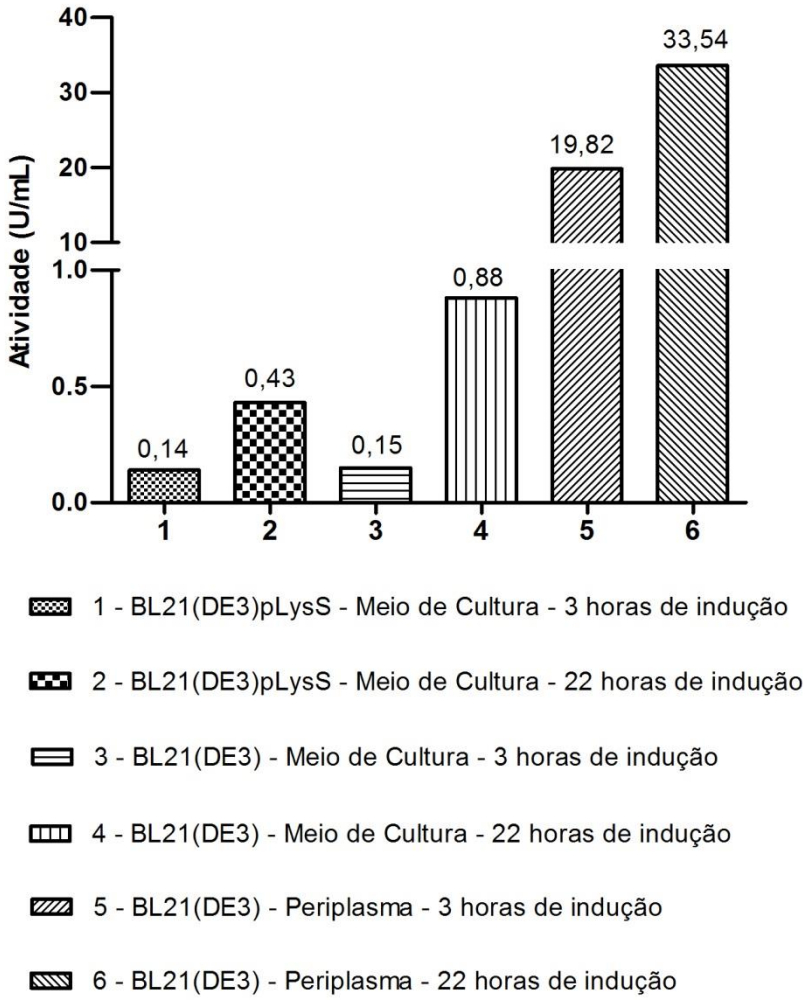


Gráfico 1 – Comparação da atividade por mililitro (U/mL) de L-asparaginase selvagem, obtida a partir da construção em pET15b, transformada nas cepas de *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS, após 3 e 22 horas de indução. A quantificação da atividade foi realizada pelo método de Nessler, em amostras não purificadas do meio de cultura e periplasma, tendo como branco o meio de cultura e periplasma dos controles negativos (cepas transformadas com pET15b Ø).

Ao estimar-se a concentração de L-asparaginase (item 4.2.3.5.1), descontando-se a concentração de proteína total dos controles negativos (pET15b Ø) da concentração de proteína total das amostras produtoras de L-asparaginase (pET15b + gene *ansB*), observou-se que a atividade específica (U/mg de L-asparaginase) presente no periplasma das células de *E. coli* BL21(DE3), em ambos os tempos de indução, foi praticamente a mesma, sendo 34,18 U/mg e 39,83 U/mg, para indução por 3 e 22 horas, respectivamente. Já a estimativa das concentrações de L-asparaginase nos meios de cultura não foi conclusiva, visto que as concentrações de proteína total foram semelhantes entre o controle negativo e as

amostras produtoras de L-asparaginase. Este resultado pode ter sido ocasionado pela pequena quantidade de L-asparaginase e pelo excesso de outras proteínas nestas amostras.

5.2.1 Otimização da determinação da atividade enzimática de L-asparaginase

Conforme descrito, na fração periplasmática da construção em BL21(DE3) foram realizados testes adicionais para a otimização da determinação da atividade enzimática de L-asparaginase.

No primeiro destes testes (variação do tempo de reação entre 10 e 30 min) obteve-se a melhor atividade específica (69,1 ± 0,9 U/mg) com 10 min de reação, tempo este que já havia sido utilizado por Mehta et al. (2014), Vidya, Ushasree e Pandey (2014) e Khushoo et al. (2004). Conforme se verifica no gráfico 2, conforme aumenta-se o tempo de reação, a atividade específica decai sistematicamente, chegando por fim a 51,0 ± 1,1 U/mg após 30 min, isto é, 27% menor do que a atividade específica obtida após 10 min de reação. Estes resultados indicam que, após 10 min, a maior parte do substrato já foi convertida em produto; como o tempo de reação é o denominador no cálculo da atividade absoluta, a atividade específica torna-se subestimada quando este tempo é aumentado.

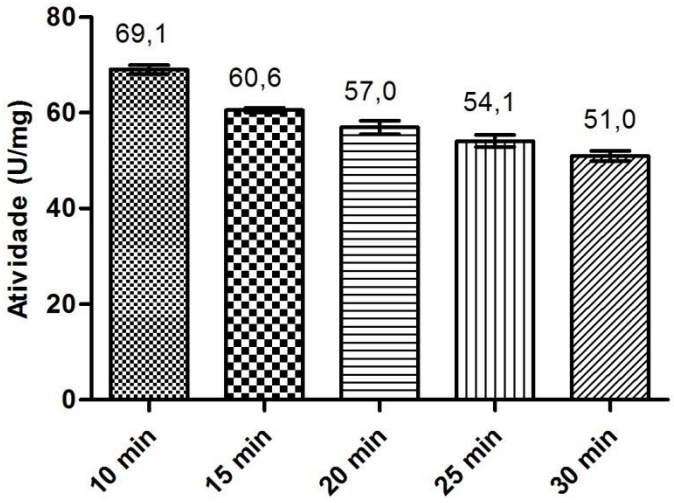


Gráfico 2 – Comparação da Atividade Específica (U/mg) pelo método de Nessler da EcA II selvagem, obtida a partir da construção BL21(DE3)/pET15b + *ansB* selvagem, após os tempos de reação de 10, 15, 20, 25 e 30 min. Conforme evidenciado, a melhor atividade específica é obtida após 10 min de reação.

Já no segundo teste de otimização realizado – verificação da influência da glicina na atividade de L-asparaginase – atividade específica (U/mg), sem a adição da glicina e após 10 min de reação, foi 69,1 ± 0,9 U/mg. Quando esta mesma amostra foi adicionada de glicina, a atividade específica resultante, igualmente medida após 10 min de reação, chegou a 83,6 ± 8,4 U/mg, *i.e.*, houve um aumento de 21% na atividade específica da enzima devido à adição deste aminoácido. Estes resultados estão representados no gráfico 3.

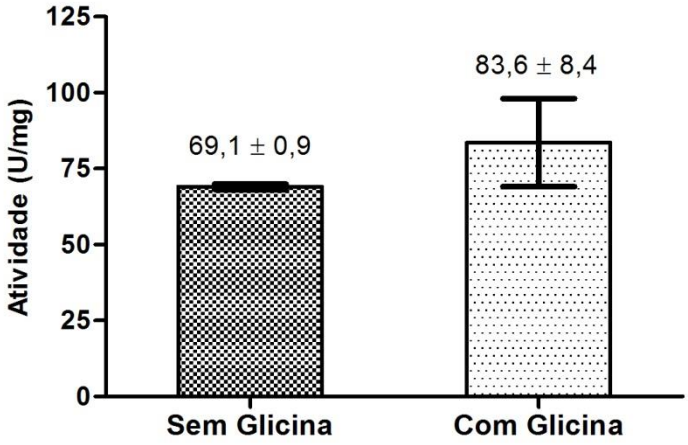


Gráfico 3 – Comparação da Atividade Específica (U/mg) pelo método de Nessler da EcA II selvagem, obtida a partir da construção BL21(DE3)/pET15b + *ansB* selvagem, após 10 min de reação, com e sem a adição de glicina 100 mM.

Este aumento na atividade específica da EcA II com a adição da glicina era esperado, visto que este aminoácido é um osmólito protetor. Osmólitos protetores são moléculas orgânicas, como polióis ou aminoácidos, conhecidas por aumentarem a estabilidade e a atividade de enzimas, favorecendo a hidratação e o dobramento correto destas, inibindo e revertendo a agregação protéica (WAREPAM; SINGH, 2015). Recentemente, foi demonstrado também que a glicina a 100 mM elevou consideravelmente a termoestabilidade da EcA II à exposição prolongada à 45 e à 50 ^{o}C, além de aumentar em 4 ^{o}C a temperatura de fusão de uma solução contendo esta enzima (FU et al., 2015).

5.2.2 Otimização do cultivo e produção de L-asparaginase em microplacas

Inicialmente o cultivo dos padrões positivo e negativo foi realizado em placas de 340 µL, contendo 170 µL de meio, sob a rotação de 180 rpm, a 37 °C. Contudo, nestas condições, a OD_{600} permaneceu por volta de 0,4, mesmo após 6 horas de crescimento, não sendo possível chegar à OD_{600} adequada (entre 0,6 e 0,8) para a indução da síntese da L-asparaginase. No intuito de melhorar a aeração das culturas, elevou-se a velocidade de agitação para 250 rpm. Nesta velocidade as

células cresceram adequadamente, e não houve contaminação, uma vez que os poços contendo apenas meio LB, intercalando os poços contendo os controles positivo e negativo, permaneceram sem qualquer crescimento bacteriano (*i. e*., com OD_{600} média de 0,070, equivalente à OD_{600} de meio LB estéril).

Posteriormente testou-se a placa de 2 mL, uma vez que um maior volume de cultura permitiria, em última instância, um maior volume de extrato periplasmático, com maior quantidade de proteínas. Em todos os volumes testados houve crescimento bacteriano adequado, e definiu-se, então, o maior volume (1100 µL) para os testes subsequentes. A atividade (U) por miligrama de proteína total foi comparada entre seis amostras, cultivadas em 1100 µL. O coeficiente de variação percentual (CV%) da resposta destas seis amostras foi de 13,61%, obtendo-se uma média de 44,48 U/mg de proteína total, com desvio padrão de ± 6,05 U/mg.

5.3 PRODUÇÃO DA BIBLIOTECA DE CLONES

O primeiro passo para a produção da biblioteca de clones foi a obtenção e quantificação dos plasmídeos pET15b, vazios e contendo o gene *ansB*, conforme descrito no item 4.3.1. Nesta etapa foi possível obter cerca de 10 ng/µL tanto do plasmídeo pET15b vazio quanto do plasmídeo pET15b com o gene *ansB*, correspondendo a cerca de 1,5 ng/µL do gene (figura 3A). O plasmídeo pET15b com o gene *ansB* foi então concentrado 10 x em *speed vacum Concentrator plus* da *Eppendorf*, e, na concentração de 15 ng/µL, foi utilizado como molde da reação de epPCR, no volume de 1 µL.

A epPCR foi realizada utilizando-se o kit *GeneMorph II* da *Agilent Technologies*. Segundo as instruções do fabricante deste kit, a quantidade de DNA alvo utilizada, 15 ng, é suficiente para produzir uma alta taxa de mutações – de 9 à 16 mutações por kb – após 30 ciclos de reação (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014), a qual poderia resultar em uma grande quantidade de proteínas truncadas e não funcionais. Conforme discutido no item 2.2, na epPCR existem duas maneiras de se reduzir a taxa de mutações: aumentando a quantidade de DNA alvo e/ou diminuindo o número de ciclos de reação (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014; RASILA et al.,

2009). Neste trabalho, optou-se pela redução do número de ciclos de reação – de 30 para 20 ciclos – visto que, sendo o tampão do plasmídeo distinto do tampão de reação da epPCR, a adição de um maior volume do plasmídeo poderia interferir negativamente na reação.

Após a reação de epPCR, o produto desta foi purificado e avaliado em gel de agarose (figura 3B). Ambos o produto da epPCR e o plasmídeo pET15b foram digeridos (item 4.3.2), sendo posteriormente purificados e quantificados (figura 3C). Na sequência, o produto da epPCR foi ligado ao vetor pET15b (item 4.3.3), e o produto da ligação foi então transformado na cepa BL21(DE3) (item 4.3.4). A partir desta transformação, obtiveram-se milhares de colônias, das quais 1128 foram escolhidas para compor a biblioteca de clones criopreservada (item 4.3.5).

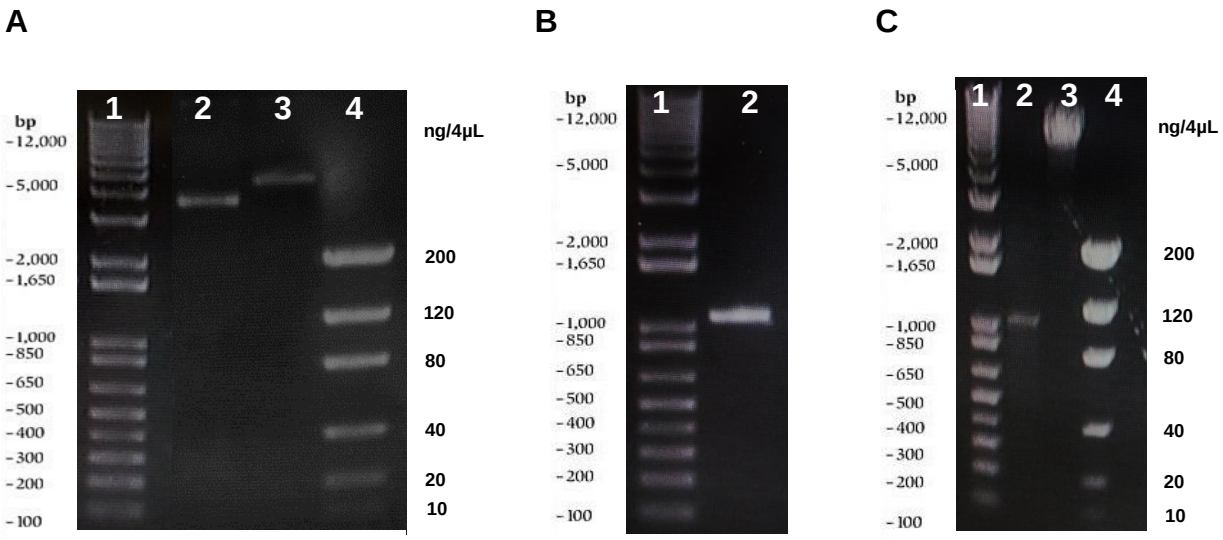


Figura 3 – Construção dos clones do gene *ansB* em vetor de super expressão pET15b. Fotografias de géis de agarose a 1%, contendo 1 µM de brometo de etídio, visualizados sob luz UV, após separação do DNA por eletroforese. Em todas as figuras, a coluna 1 refere-se ao padrão de massa molecular 1Kb *Plus DNA Ladder* (*Invitrogen*), cujo tamanho de cada banda (em pares de bases – *bp*) está indicado ao lado esquerdo da figura. Nas figuras A e C, a coluna 4 refere-se ao padrão de quantificação *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen), cujas concentrações de DNA (ng/ 4 µL) de cada banda estão indicadas ao lado direito da figura. **(A)** Quantificação dos plasmídeos pET15b vazio (coluna 2) e pET 15b contendo o gene *ans*B (coluna 3), após purificação por mini preparação plasmidial. **(B)** Produto da epPCR após purificação (coluna 2). **(C)** Quantificação do produto da epPCR (coluna 2) e do vetor pET15b (coluna 3) após digestão e purificação.

5.4 TRIAGEM DOS CLONES PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE ATIVA

Foi realizada a triagem de 1128 clones, seguindo as etapas descritas em 4.4.1 e 4.4.2, obtendo-se os seguintes resultados (demonstrados no gráfico 4):

- 58 clones (5,14%) não cresceram;
- 1001 clones (88,74%) perderam completamente a atividade (Abs $_{440\ nm}$ < 0,01);
- 31 clones (2,75%) apresentaram atividade residual (Abs $_{440\ nm}$ entre 0,01 e 0,09);
- 38 clones (3,37%) apresentaram atividade (Abs $_{440\ nm}$ ≥ 0,1) e para estes foi realizada a quantificação de proteína total por Bradford (item 4.2.3.8).

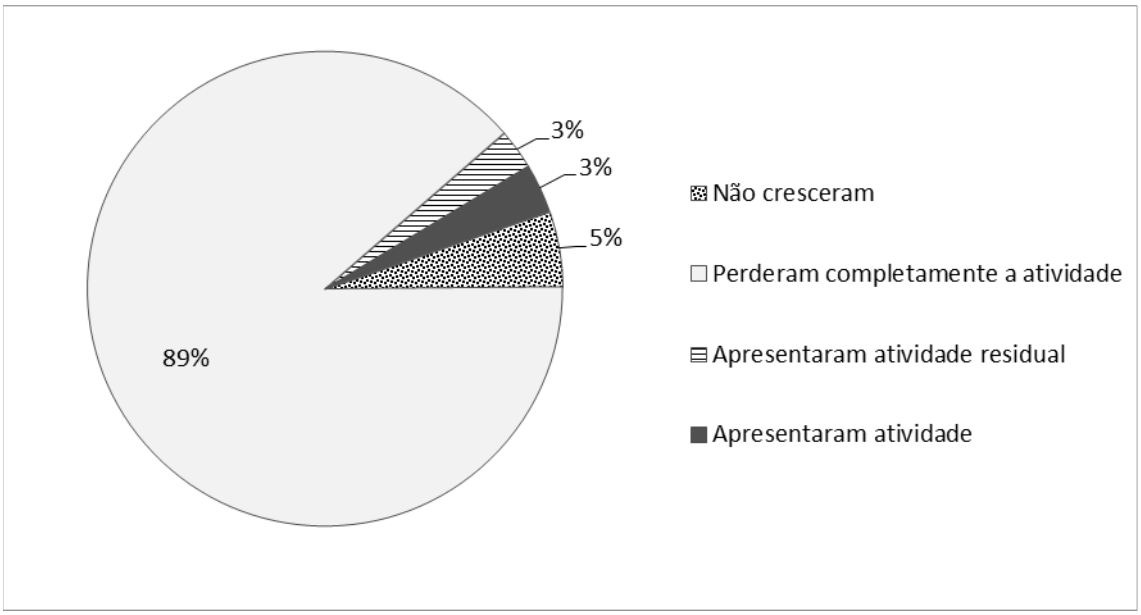


Gráfico 4 – Resultado da triagem dos 1128 clones produzidos por epPCR do gene *ansB* da EcA II selvagem

O número total de clones triados (1128), de acordo com Cheng, Zhu e Schwaneberg (2015), está dentro do usual (1000 – 2000 clones) em métodos de epPCR, apesar de ser um número negligenciável quando comparado ao número teórico de possibilidades: para uma enzima hipotética, com apenas 100 aminoácidos, haveria 19^{100} possibilidades de mutações de um único aminoácido (Labrou, 2009). É devido a esta limitação na quantidade de clones triados que se faz imperativo utilizar um método que produza uma biblioteca com mutações não

tendenciosas, como a epPCR, de modo a aumentar a probabilidade de se obter um mutante com as qualidades desejadas (RASILA et al., 2009; WONG, ROCCATANO, SCHWANEBERG, 2007).

A respeito dos 58 clones (5%) que não cresceram, isto possivelmente ocorreu devido a uma inoculação inadequada, a partir da biblioteca criopreservada. Segundo Duetz et al. (2000), o meio de cultura líquido, utilizado nas bibliotecas, juntamente com o glicerol, congela-se em padrões imprevisíveis, podendo assumir a forma côncava ou convexa, impossibilitando o alcance adequado de todos os pinos do replicador.

Quanto aos clones inativos ou com baixa atividade, apesar destes não terem sido sequenciados, acredita-se que se obteve uma alta taxa de mutações nos 1001 clones (89%) que perderam completamente a atividade e nos 31 (3%) que mantiveram atividade apenas residual. Isto porque, de acordo com Dalby (2011), em experimentos de mutagênese aleatória, existe uma porcentagem fixa de mutações deletérias, o que leva a um aumento exponencial na proporção de enzimas não funcionais com o aumento da taxa de mutações. De acordo com Romero e Arnold (2009), essa porcentagem de mutações deletérias pode chegar 99,99%, sendo que 30 a 50% das mutações de um único aminoácido são altamente deletérias, 50 a 70% são neutras ou fracamente deletérias, e apenas 0,01 a 1% são benéficas. Por outro lado, nesta dissertação, a inatividade pode ter sido ocasionada também por mutações simples, mas altamente deletérias, que tenham destruído a estrutura quartenária da enzima, a qual é essencial para a sua atividade (BOREK et al., 2014; VERMA et al., 2014).

A respeito dos 38 clones (3%) com atividade, após a quantificação da concentração proteica, a atividade resultante variou entre 6,68 a 42,08 U/mg de proteína total, sendo 14 destes valores dentro da margem de erro das 12 replicatas biológicas do padrão positivo (28,12 ± 14,25 U/mg de proteína total). Os 14 clones com esta atividade, semelhante à atividade do padrão, foram sequenciados.

5.4.1 Sequenciamento dos Clones com Atividade Semelhante a do Padrão

Dos 14 clones sequenciados, sete não apresentaram nenhuma mutação, um apresentou apenas três mutações silenciosas, e seis apresentaram mutações não silenciosas: quatro apresentaram uma única mutação e dois apresentaram duas mutações.

Estes seis mutantes foram o 0408A, 0808C, 0810A, 1005B, 1206H e 1212H, apresentando as mutações K22R, T80M/K139N, P40S/S206C, T161I, Q190L e V154M, respectivamente. Estes foram considerados como mutantes neutros, tendo em vista que mantiveram a atividade do padrão. Até o momento da elaboração desta dissertação, nenhum destes mutantes havia sido descrito na literatura (OFFMAN et al., 2011; VIDYA; USHASREE; PANDEY, 2014; CHAN et al., 2014; MEHTA et al. 2014; VERMA et al. 2014).

O gráfico 5 apresenta uma comparação entre a atividade (U/mg de proteína total) dos 38 clones submetidos a quantificação de proteína total, estando destacados em branco (liso e tracejado) os 14 clones classificados como possuindo atividade semelhante ao padrão. São mostrados em tracejado os mutantes, da esquerda para a direita, K22R, T80M/K139N, P40S/S206C, T161I, Q190L e V154M.

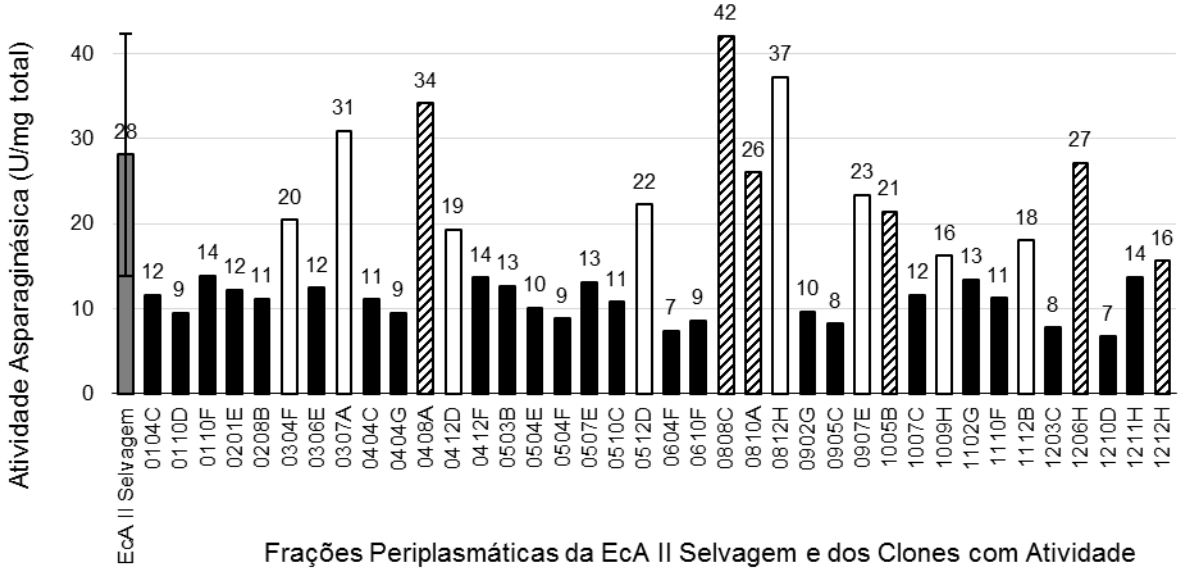


Gráfico 5 – Comparação da Atividade (U/mg de proteína total) das frações periplasmáticas da EcA II selvagem (padrão positivo) e de clones produzidos por epPCR. A atividade asparaginásica foi determinada pelo método de Nessler, diretamente nas frações periplasmáticas, obtidas por choque osmótico (Harms et al., 1991). O valor de atividade da EcA II selvagem (coluna cinza) corresponde à média de 12 replicatas biológicas (28,12 ± 14,25 U/mg de proteína total). Durante a triagem, os clones foram testados apenas uma vez, não sendo, portanto, apresentada barra de erro para estes. Dentre os 38 clones com atividade asparaginásica, 14 mostraram atividade equivalente a da EcA II selvagem e estão realçados em branco (liso e tacejado). Destes, seis (realçados em tracejado), apresentaram mutações não-silenciosas (da esquerda para a direita, K22R, T80M/K139N, P40S/S206C, T161I, Q190L e V154M).

5.4.2 Análise *in silico* das Mutações Obtidas

Conforme descrito em 4.4.4, as mutações foram analisadas quanto a sua localização na proteína (domínios, estrutura quartenária e estrutura secundária), sua possível interferência na atividade glutaminásica, sua interferência nos sítios preditos para a CTSB e a AEP e a conservação evolutiva dos resíduos mutados.

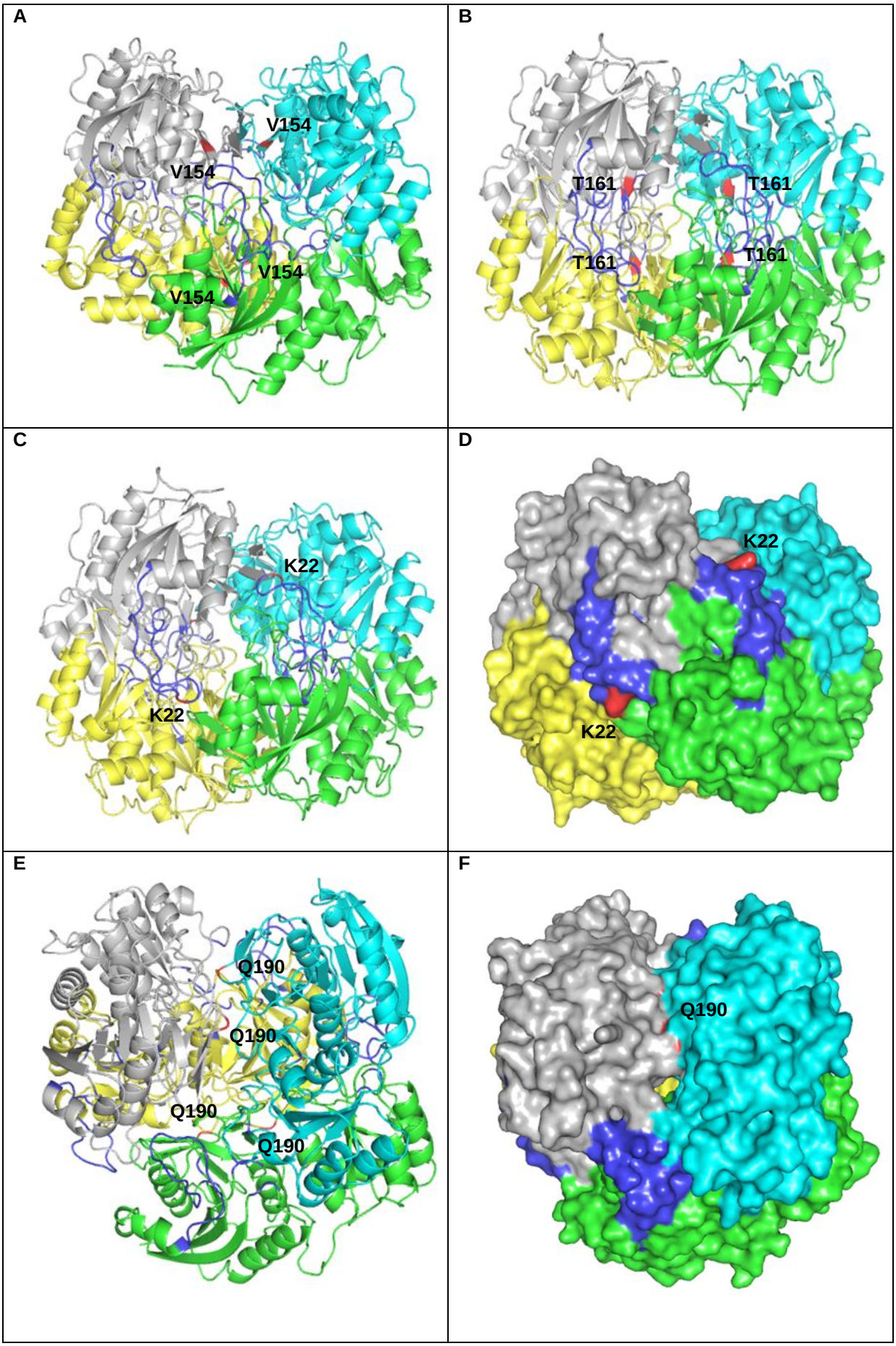
5.4.2.1 Análise da localização das mutações

Quanto à localização das mutações nos domínios, dentre as oito mutações obtidas, sete foram no domínio N-terminal: K22R, V154M, T161I, Q190L, P40S, T80M e K139N. Dentre estas, duas (K22R e T161I) foram próximas ao sítio ativo, sendo a K22R parte do *loop* flexível. Quanto à localização das mutações na estrutura quaternária, duas das mutações do domínio N-terminal (V154M e T161I) foram internas aos monômeros; uma (Q190L) foi na superfície dos monômeros, na interface dos dímeros não íntimos (AD e BC); as outras cinco mutações (incluindo a mutação C-terminal S206C) foram na superfície do tetrâmero. Quanto à localização das mutações na estrutura secundária, as duas mutações internas aos monômeros (V154M e T161I) foram em folhas β, enquanto a mutação de superfície P40S foi em uma α-hélice; todas as outras mutações foram em alças. Estes dados estão resumidos na tabela 9 e demonstrados na figura 4.

Tabela 9 - Características dos mutantes ativos de EcA II gerados após um ciclo de epPCR

Mutantes	**Alterações no Códon**	**Domínio** [a]	**Estrutura Secundária** [a]	**Estrutura Quartenária** [a]	**Proximidade ao Sítio Ativo** [a]
K22R	aaa → a**g**a	N-terminal	Alça	*Loop* flexível	Próximo
V154M	gtc → **a**tc	N-terminal	Folha β	Interna	Distante
T161I	acc → a**t**c	N-terminal	Folha β	Interna	Próximo
Q190L	cag → c**t**g	N-terminal	Alça	Interface dos dímeros não íntimos	Distante
P40S/S206C	ccg → **t**cg/ agt → **t**gt	N-terminal/ C-terminal	α-hélice / Alça	Ambas na Superfície do tetrâmero	Próxima ao *loop*/ Distante
T80M/K139N	acg → a**t**g/ aaa → aa**t**	N-terminal/ N-terminal	Alça / Alça	Ambas na Superfície do tetrâmero	Ambas Distantes

[a] Localização das mutações avaliada na estrutura cristalográfica da EcA II selvagem, publicada no PDB (ID: 3ECA, SWAIN et al., 1993), e exibida pelo programa PyMOL (DELANO, 2002).


A
V154
V154
V154
V154
B
T161
T161
T161
T161
C
K22
K22
D
K22
K22
E
Q190
Q190
Q190
Q190
F
Q190

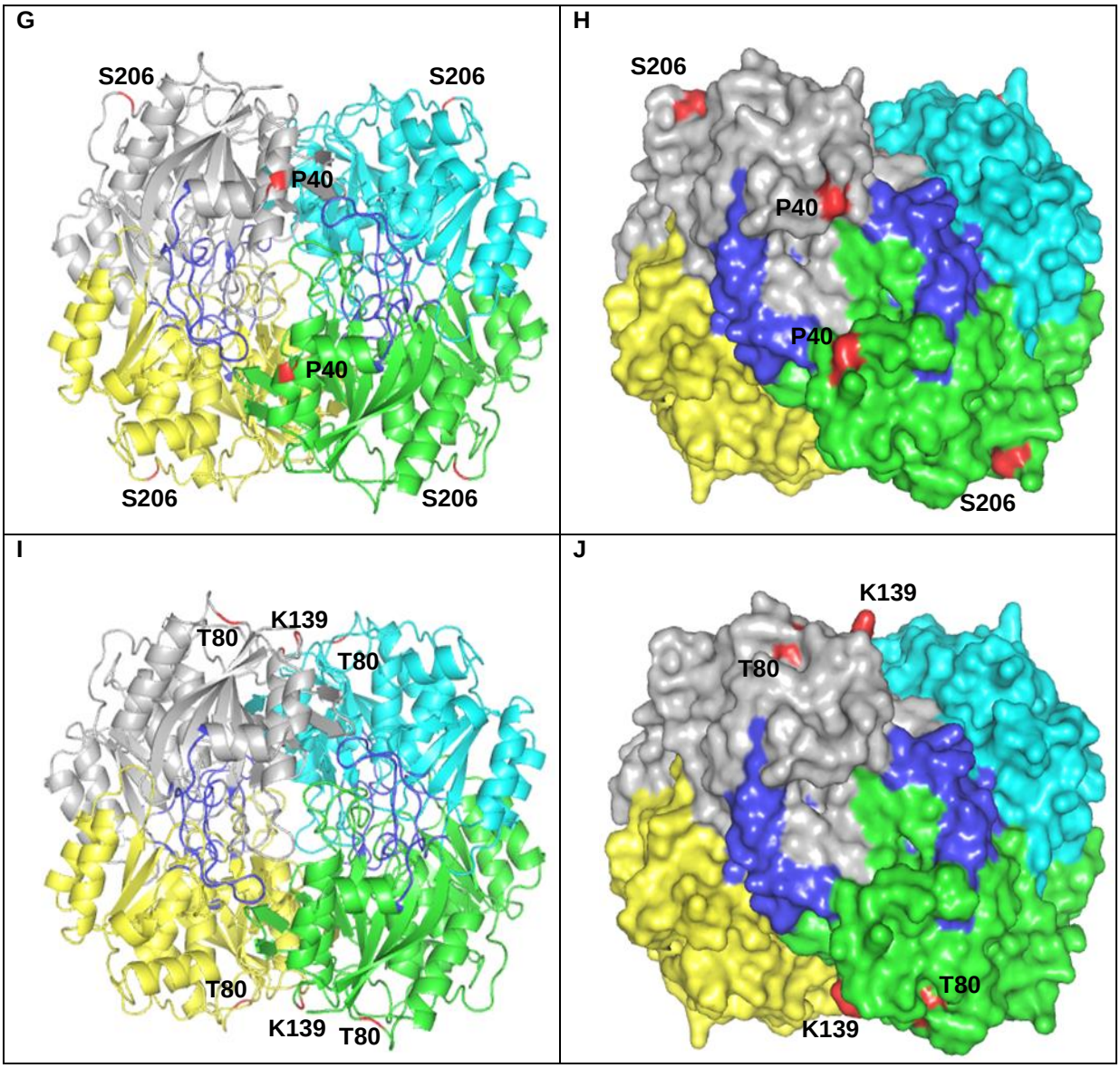


Figura 4 – Representação da estrutura cristalográfica da EcA II em *cartoon* (imagens A, B, C, E, G e I) e superfície (imagens D, F, H e J). Em todas as imagens o *loop* flexível e o sítio ativo estão representados em azul escuro, enquanto as subunidades A, B, C e D estão representadas em verde, cinza, ciano e amarelo, respectivamente. Os resíduos mutados estão representados em vermelho nas seguintes imagens: **(A)** V154; **(B)** T161; **(C)** e **(D)** K22; **(E)** e **(F)** Q190; **(G)** e **(H)** P40 e S206; **(I)** e **(J)** T80 e K139. A estrutura cristalográfica foi obtida no PDB (ID: ECA3, SWAIN et al., 1993) e exibida pelo programa PyMOL (DELANO, 2002).

5.4.2.2 Predição de alterações na atividade glutaminásica

Quanto às predições de alteração na atividade glutaminásica, sabe-se que a especificidade ao substrato glutamina, frente à asparagina, é dependente principalmente de três fatores: a flexibilidade do *loop*, o tamanho da cavidade do sítio ativo e o grau de compactação do tetrâmero. Estes fatores se explicam devido ao tamanho da glutamina, que, por ser cerca de 10% maior do que a asparagina (146 x 132 g/mol), teria seu acesso ao sítio ativo prejudicado com a diminuição da flexibilidade do *loop* e do tamanho da cavidade do sítio ativo, e com o aumento da compactação do tetrâmero (OFFMAN et al., 2011; LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010).

Frente a isso, o mutante K22R, poderia reduzir a atividade glutaminásica através da redução da flexibilidade do *loop* e do tamanho da cavidade do sítio ativo. Isto porque a arginina é um aminoácido cerca de 20% maior do que a lisina (174 x 146 g/mol), e a posição 22 está no centro do *loop* flexível (resíduos 14-33), o qual se fecha sobre a cavidade do sítio ativo, posicionando adequadamente os resíduos envolvidos na catálise (OFFMAN et al., 2011).

Já os resíduos Q190L e T161I foram preditos como candidatos a diminuir a atividade glutaminásica por aumentar a compactação do tetrâmero. Este efeito do aumento da compactação do tetrâmero foi visto por Offman et al. (2011) através dos mutantes da EcA II N24A/R195S e N24A/Y250L, que aumentaram a compactação do tetrâmero (efeito estudado por dinâmica molecular) e reduziram a atividade glutaminásica. O resíduo Q190, na estrutura do tetrâmero, está próximo ao R195, levando a suposição de que o mutante Q190L poderia ter um efeito semelhante ao R195S. Além disso, nenhum dos resíduos polares Q190 ou T161 apresenta claramente um parceiro hidrofílico para a formação de uma ponte de hidrogênio; porém, ambos, possuem resíduos vizinhos hidrofóbicos: uma tirosina e uma valina, respectivamente. A substituição da Q190 por uma leucina, e da T161 por uma isoleucina poderia favorecer a interação destes com os resíduos hidrofóbicos vizinhos e, assim, aumentar a compactação do tetrâmero.

5.4.2.3 Interferência nos sítios preditos para AEP e CTSB

A protease AEP cliva especificamente após resíduos de asparagina e de aspartato, e seus sítios de clivagem na EcA II selvagem, N24, D124 e N143, já foram definidos por Patel et al. (2009). Nenhum dos mutantes obtidos alterou qualquer um destes sítios, contudo, o mutante K139N poderia ter criado um novo sítio de clivagem para a AEP.

A respeito da CTSB, esta é capaz de reconhecer uma vasta gama de combinações de resíduos e, até o momento, ainda não foram definidos os sítios proteolíticos para a CTSB na EcA II selvagem. Por isso, inicialmente realizou-se a predição destes sítios, através da plataforma *SitePrediction* (VERSPURTEN et al., 2009), na EcA II selvagem. Obtiveram-se, expostos na superfície da molécula, doze sítios proteolíticos preditos com mais de 95% de especificidade, e, dentre eles, quatro com mais de 99% de especificidade (tabela 10).

Tabela 10 – Predição dos sítios proteolíticos pra a CTSB na EcA II selvagem

Posição	**Sítio**	**Especificidade**
Superfície do tetrâmero		
79 a 84 *	KTDG.FV *	>95%
110 a 115	VMVG.AM	>95%
137 a 142 *	ADKA.SA *	>95%
169 a 174	ATFK.SV	>95%
177 a 182	GPLG.YI	>99%
202 a 207 *	PFDV.SK **	>95%
211 a 216	LPKV.GI	>95%
212 a 217	PKVG.IV	>99%
226 a 231	LPAK.AL	>99%
235 a 240	GYDG.IV	>99%
253 a 258	VFDT.LA	>95%
266 a 271	AVVR.SS	>95%

* Sítios modificados pelo duplo mutante T80M/K139N. ** Sítio modificado pelo mutante P40S/S206C

Em um segundo passo, realizou-se a mesma predição para cada um dos mutantes. Dentre estes, dois levaram à extinção de dois dos sítios preditos na EcA II selvagem: o sítio ^{137}AD<u>K</u>A.SA^{142} pelo resíduo K139N do duplo mutante T80M/K139N, e o sítio ^{202}PFDV.<u>S</u>K^{207} pelo resíduo S206C do duplo mutante P40S/S206C. Acredita-se que estes dois sítios extintos possam ser importantes, tendo em vista que são dois sítios altamente expostos na superfície da molécula.

Contudo, o outro resíduo do duplo mutante T80M/K139N, o T80M, modificou o sítio ^{79}K<u>T</u>DG.FV^{84} para ^{79}K<u>M</u>DG.FV^{84}, elevando à especificidade deste à maior do que 99%, o que pode neutralizar a possível resistência gerada pelo K139N.

Por fim, o mutante T161I criou um novo sítio proteolítico para CTSB, ^{157}GRDV.<u>I</u>K^{162}, com especificidade maior do que 95%. Este sítio, contudo, está completamente interno à molécula e, possivelmente, inacessível à CTSB.

5.4.2.4 Conservação evolutiva das mutações

Através do alinhamento dado pela plataforma NCBI Blast, avaliou-se a conservação evolutiva entre 62 sequências da base de dados *UniProtKB/Swiss-Prot*, incluindo a EcA II selvagem (UniProt ID: P00805), frente a uma 63ª sequência hipotética, contendo todas as oito mutações obtidas. O alinhamento completo está no anexo E, sendo a sequência hipotética mutante identificada como “query_16673”.

A respeito da conservação evolutiva dos oito resíduos mutados na EcA II (K22, P40, T80, K139, V154, T161, Q190 e S206), dentre estes, o P40 é o mais conservado, estando presente em 82% das sequências, seguido por T161 (27% das sequências), V154 (24% das sequências), S206 (21% das sequências), K139 (13% das sequências), T80 (5% das sequências), Q190 (3% das sequências) e K22, presente apenas na EcA II selvagem. Nesta última posição, 60% das sequências apresenta uma tirosina.

A respeito das mutações obtidas, apenas a leucina, na posição 190 (Q190L) foi largamente encontrada nas proteínas alinhadas: está presente em 37% destas sequências. Nesta mesma posição, 34% das sequências apresentam aminoácidos aromáticos (24% fenilalanina e 10% tirosina) e apenas 14% apresentam aminoácidos polares não carregados como a EcA II selvagem.

Os outros resíduos mutantes estão presentes em poucas ou em nenhuma sequência. A exemplo, a N139 está presente em cinco sequências, sendo uma de *Acinetobacter glutaminasificans* (UniProt ID: P10172) e quatro de *Schizosaccharomyces pombe* (UniProt ID: P87015, Q8NKC0, Q9UTS7 e Q8TFF8). Já a S40 e a I161 estão presentes em duas sequencias cada: ambas na sequência

de *Bacillus subtilis* (UniProt ID: P26900), S40 na sequência de *Thermoplasma acidophilum* (UniProt ID: Q9HJJ5) e I161 na sequência de *Helicobacter pylori* (UniProt ID: O25424). Por fim, a R22 está presente apenas na sequência de *Bacillus licheniformis* (UniProt ID: P30363), enquanto M80, M154 e C206 não estão presentes em nenhuma sequência.

Contudo, apesar de não estar claro o significado desta observação, é interessante realçar que, nestas últimas três posições citadas (M80, M154 e C206), há grande quantidade de aminoácidos pertencentes à mesma classe das mutações obtidas: nas posições 80 e 154, 56% e 100% das sequências, respectivamente, também contêm um aminoácido alifático apolar, enquanto na posição 206, 44% das proteínas (incluindo a EcA II selvagem) contêm um aminoácido polar não carregado.

5.4.3 Confirmação da Equivalência entre as Atividades Asparaginásicas

Conforme descrito em 4.4.1, o volume de cultivo na triagem foi de apenas 1,1 mL, o que pode ter sido um dos motivos para a grande margem de erro (coeficiente de variação percentual de 50,69%) entre as 12 replicatas biológicas do padrão positivo. No intuito de minimizar este erro, e confirmar a equivalência entre a atividade dos seis mutantes e da EcA II selvagem, realizou-se o cultivo dos seis mutantes, juntamente com os dois padrões, em 100 mL de meio de cultura, em triplicata biológica (item 4.4.5).

No periplasma extraído destes cultivos, confirmou-se a presença da L-asparaginase por SDS-Page (figura 5). Como se pode notar, tanto o padrão positivo quanto todos os seis mutantes apresentaram uma banda prevalente na mesma região da banda do medicamento Kidrolase® (*EUSA Pharma SAS*), utilizado como controle neste ensaio. Claramente, esta banda está ausente no padrão negativo.

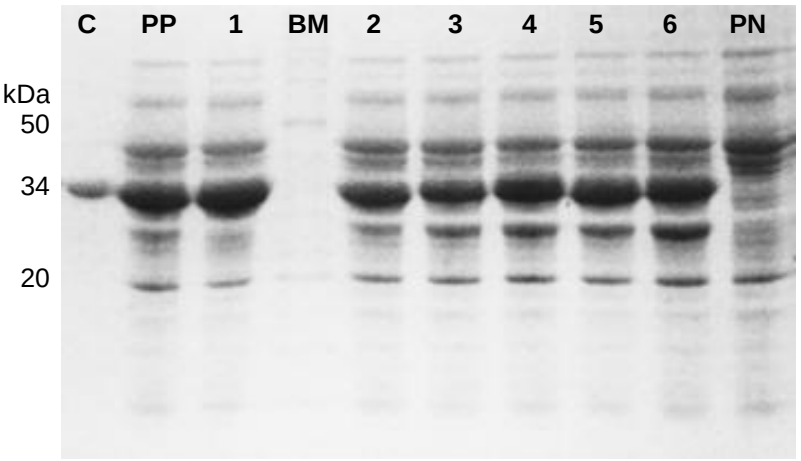


Figura 5 – Resultado da eletroforese em SDS-Page das frações periplasmáticas dos padrões e dos mutantes, onde **(BM)** refere-se ao padrão de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen); **(C)** se refere ao medicamento Kidrolase® (EUSA Pharma SAS); **(PP)** à fração periplasmática do padrão positivo (BL21(DE3)/pET15b+ansB selvagem); **(PN)** à fração periplasmática do padrão negativo (BL21(DE3)/pET15b Ø), e os números de **1 à 6** às frações periplasmáticas dos mutantes, respectivamente, K22R, T80M/K139N, P40S/S206C, T161I, Q190L, V154M. De cada fração periplasmática (PP, PN e 1-6) foram aplicados 50 µg de proteína total. Nota-se a presença clara de uma banda dominante no padrão positivo e nos mutantes, com posição equivalente à do medicamento Kidrolase. A mesma banda está ausente no padrão negativo.

Quanto à atividade asparaginásica determinada nestes periplasmas, através da análise de variância pelo teste de comparação múltipla de Dunnett (*GraphPad Prism 5*), verificou-se que nenhum dos seis mutantes apresentou diferenças significativas (considerando $P < 0,05$) no valor de atividade em relação ao padrão (EcA II selvagem). Os valores de atividade obtidos estão plotados no gráfico 6.

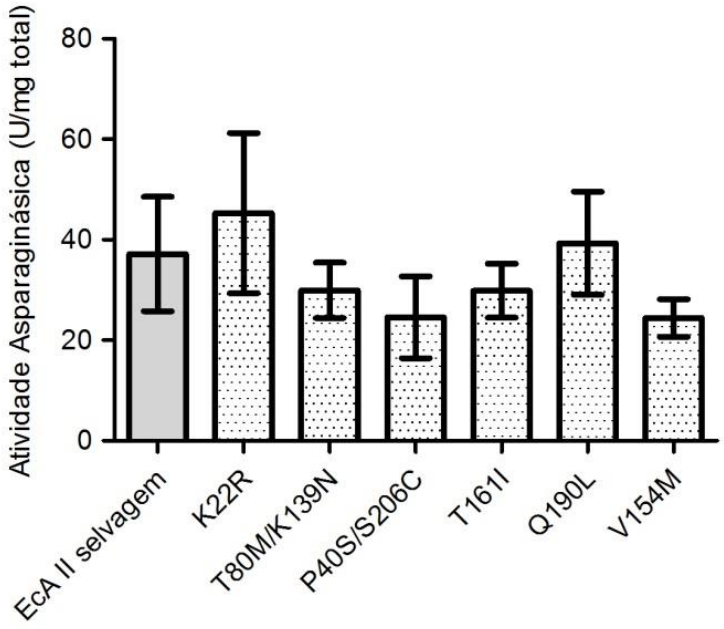


Gráfico 6 – Comparação da Atividade (U/mg de proteína total) das frações periplasmáticas da EcA II selvagem (coluna cinza) e dos seis mutantes (colunas com pontos: K22R, T80M/K139N, P40S/S206C, T161I, Q190L, V154M) produzidos por epPCR. A atividade asparaginásica foi determinada pelo método de Nessler, diretamente nas frações periplasmáticas, obtidas por choque osmótico (Harms et al., 1991). Os valores de atividade correspondem a 3 replicatas biológicas e foram considerados equivalentes pelo teste comparação múltipla de Dunnet.

5.4.4 Determinação da Porcentagem de Atividade Glutaminásica

Na literatura, a atividade glutaminásica das asparaginases é geralmente referida como uma porcentagem da atividade asparaginásica, variando entre 2 e 5% para a EcA II (BOREK et al. 2014; LABROU et al. 2010; REINERT et al. 2006). Conforme descrito em 4.4.6, o último passo da triagem foi a determinação desta porcentagem nos extratos periplasmáticos brutos, através do método do hidroxamato.

Inicialmente, pensou-se em quantificar a atividade glutaminásica pelo método de Nessler, contudo, pelo fato da glutamina desaminar facilmente, houve grande interferência na absorbância do controle negativo, levando à necessidade da busca de um método onde esta interferência fosse menor, como foi no método do hidroxamato. Tendo em vista que há diferenças entre o valor de atividade quantificado por diferentes métodos, determinou-se também a atividade asparaginásica pelo método do hidroxamato, para que a relação de porcentagem

entre as duas atividades (glutaminásica e asparaginásica) fosse calculada dentro de um mesmo método.

Os valores obtidos de porcentagem de atividade glutaminásica estão plotados no gráfico 7. Estes foram: 3,2 ± 0,4 % (EcA II selvagem); 2,9 ± 0,2 % (K22R); 8,2 ± 0,8 % (T80M/K139N); 1,8 ± 0,6 % (P40S/S206C); 4,0 ± 0,4 % (T161I); 2,6 ± 0,2 % (Q190L) e 2,0 ± 0,3 % (V154M).

Através da análise de variância pelo teste de comparação múltipla de Dunnett (*GraphPad Prism 5*), verificou-se que os mutantes T80M/K139N, P40S/S206C e V154M apresentaram diferenças significativas (considerando $P < 0,05$) em relação ao padrão (EcA II selvagem), sendo que o T80M/K139N elevou esta porcentagem, enquanto o P40S/S206C e o V154M diminuíram esta porcentagem. Já os três mutantes anteriormente preditos como potenciais candidatos a diminuir a atividade glutaminásica (K22R, T161I e Q190L) apresentaram estes valores de porcentagem equivalentes à EcA II selvagem. Contudo, as proteínas ainda não estão puras, o que merece reservas quanto a esses dados.

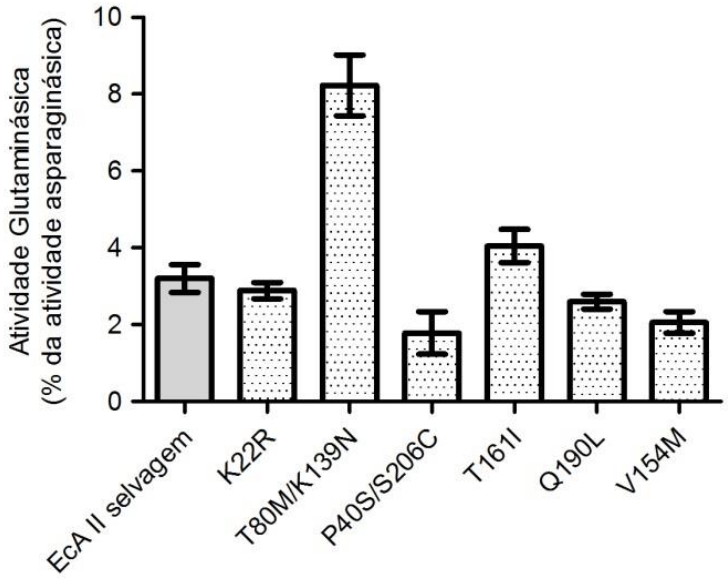


Gráfico 7 – Comparação da Atividade Glutaminásica (% da Atividade Asparaginásica) das frações periplasmáticas da EcA II selvagem (coluna cinza) e dos seis mutantes (colunas com pontos: K22R, T80M/K139N, P40S/S206C, T161I, Q190L, V154M) produzidos por epPCR. A porcentagem de atividade glutaminásica foi calculada a partir dos valores de atividade asparaginásica e glutaminásica determinados pelo método do hidroxamato, diretamente nas frações periplasmáticas, obtidas por choque osmótico (Harms et al., 1991). Pelo teste comparação múltipla de Dunnet, T80M/K139N aumentou essa porcentagem, enquanto P40S/S206C e V154M diminuíram.

5.5 PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO GRAU DE OLIGOMERIZAÇÃO

O procedimento estabelecido para a purificação (item 4.5) foi eficaz tanto para o padrão positivo quanto para todos os seis mutantes.

Na etapa de troca aniônica, os cromatogramas de todas as purificações apresentaram o mesmo perfil, mostrado na figura 6A, referente ao cromatograma de troca aniônica do padrão positivo. Em todos eles, a enzima asparaginase foi eluída entre 120 e 240 mM de NaCl (24 e 48% do tampão B), com o centro do pico de eluição entre 155 e 190 mM de NaCl (31 a 38% do tampão B).

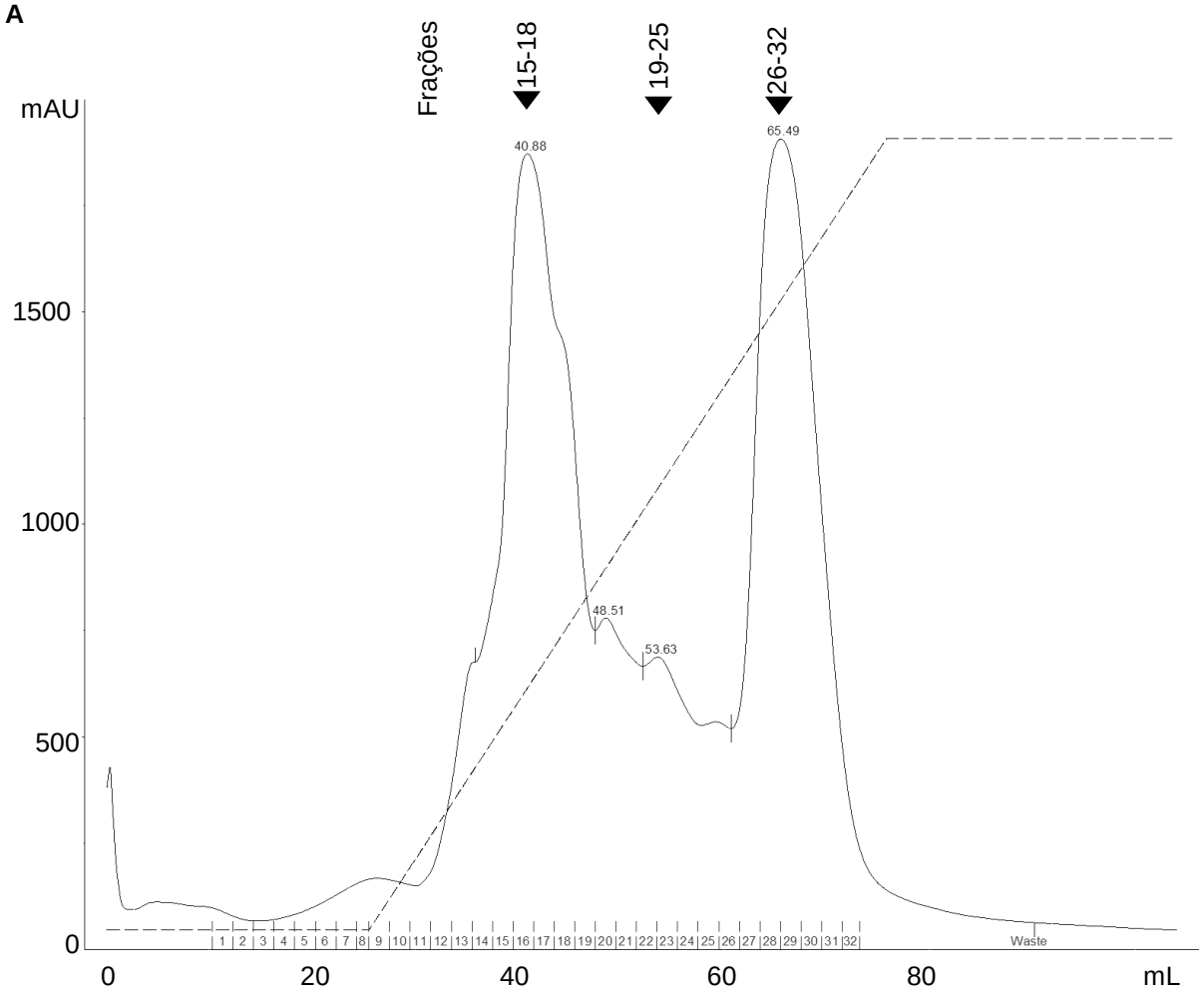
Todos os cromatogramas de troca aniônica também apresentaram um pico expressivo entre 350 e 475 mM de NaCl (70 a 95% do tampão B), o qual, apesar de apresentar uma alta absorbância a 280 nm (cerca de 1900 mAu para cada litro de meio de cultura), continham baixa concentração proteica (cerca de 0,1 mg/mL) e apresentaram bandas quase imperceptíveis no gel de poliacrilamida (figura 6B, fração 29).

No resultado mostrado da eletroforese em SDS-Page desta etapa da purificação (figura 6B) fica evidente a presença da L-asparaginase nas frações 15, 16, 17 e 18, já com um bom grau de pureza. Estas frações foram reunidas, estabilizadas com glicina 100 mM, concentradas, e aplicadas na coluna de exclusão molecular.

Os cromatogramas de exclusão molecular também foram bastante semelhantes entre o padrão positivo e todos os mutantes, sendo mostrado na figura 7A, como exemplo, o cromatograma de exclusão molecular do padrão positivo. Todos apresentaram um pico dominante entre 12,04 e 12,48 mL, seguido por dois picos menores, um entre 13,59 e 13,70 mL e outro entre 14,64 e 14,88 mL.

Através de eletroforese em SDS-Page (figura 7B) pôde-se verificar que este primeiro pico dominante continha a L-asparaginase, visualmente pura nas frações 7, 8 e 9 – utilizadas nos ensaios subsequentes – e com alguns contaminantes na fração 10. Nas frações subsequentes é possível verificar vestígios de uma banda na mesma altura da enzima.

A



B

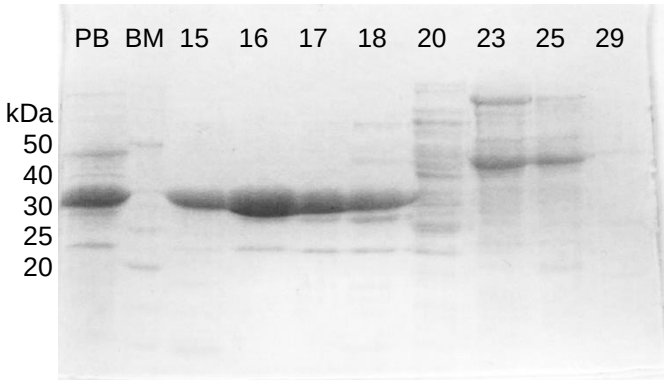
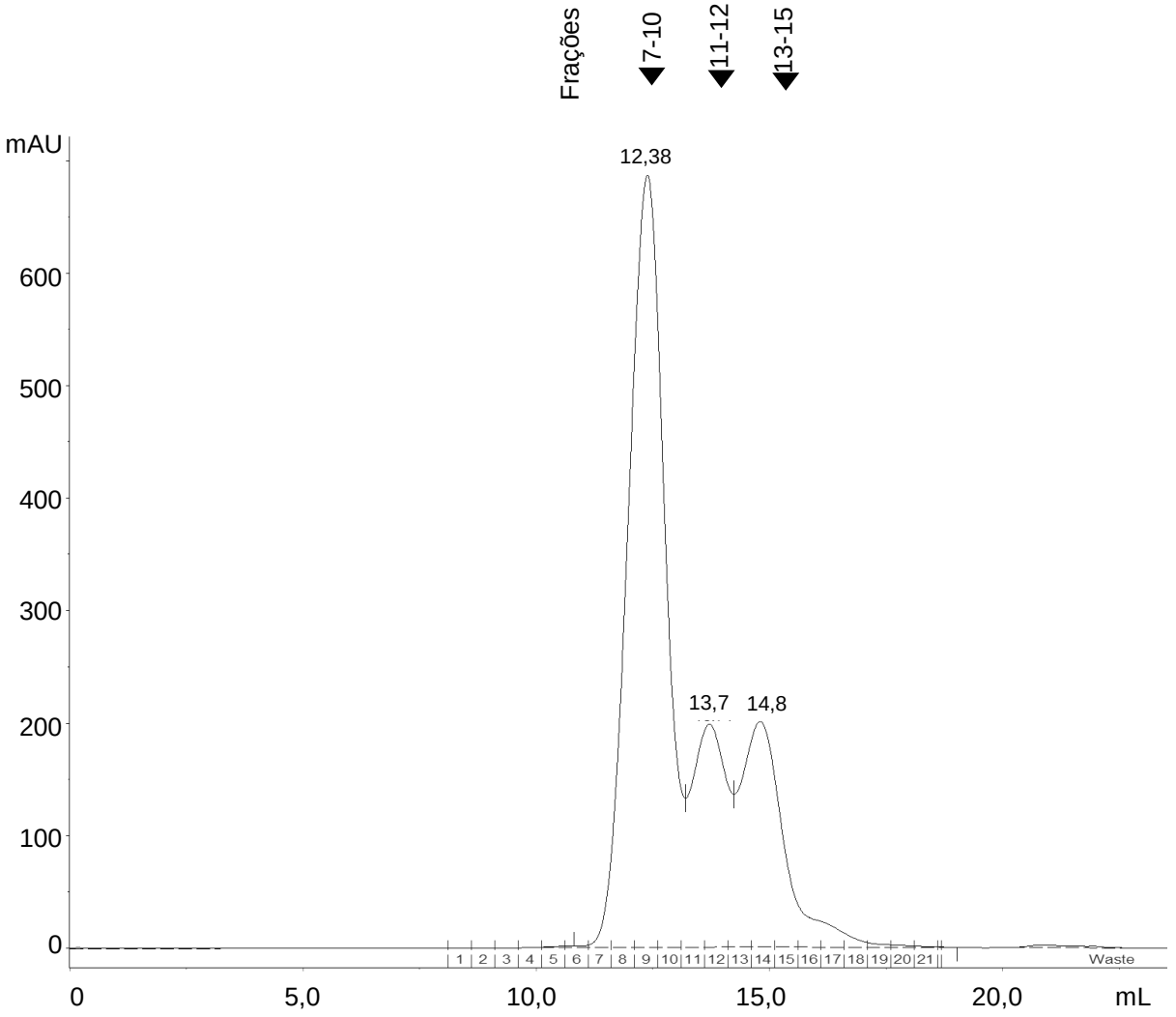


Figura 6 – Purificação da EcA II selvagem por troca aniônica **(A)** Cromatograma de purificação por troca aniônica (coluna *HiTrap™ DEAE FF, GE Life Sciences*). Eluição inicial com tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,8, seguida por gradiente linear (linha tracejada) de 0 a 100% de tampão tris-HCl 50 mM com NaCl 500 mM, pH 8,8, em 10 volumes de coluna. Eluição monitorada a 280 nm. **(B)** Resultado da eletroforese em SDS-Page, onde PB equivale ao periplasma bruto, BM ao padrão de massa molecular *BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen)* e os números de 15 à 29 equivalem às frações de mesmo número no cromatograma A. Volumes de aplicação: 5 µL para BM, 16 e 17; 10 µL para 15 e 18; 20 µL para PB e 20 à 29. Pode-se notar a presença da banda de L-asparaginase (34 kDa) no periplasma bruto e nas frações 15 à 18.

A



B

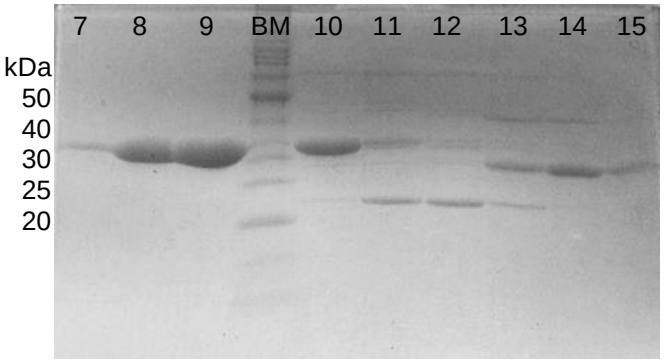


Figura 7 – Purificação da EcA II selvagem por exclusão molecular **(A)** Cromatograma de purificação por exclusão molecular (coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL GE Life Sciences) das frações 15-18 obtidas na troca aniônica. Eluição isocrática com tampão Tris-HCl 50 mM e glicina 100 mM, pH 8,6, monitorada a 280 nm. **(B)** Resultado da eletroforese em SDS-Page, onde BM equivale ao padrão de massa molecular *BenchMark™ Protein Ladder* (I*nvitrogen*) e os números 7, 8, 9 e 10 equivalem ao pico eluído a 12,38 mL, 11 e 12 ao pico eluído a 13,7 mL e 13 a 15 ao pico eluído a 14,8 mL. Volumes de aplicação: 20 µL para 7-15 e 5 µL para BM. Verifica-se que as frações 7, 8 e 9 possuem a L-asparaginase pura.

Além de possibilitar a obtenção de uma enzima altamente pura, a cromatografia de exclusão molecular possibilitou também a verificação do grau de oligomerização das L-asparaginases produzidas (item 4.5.2). Para tal, determinou-se o volume morto da coluna (8,08 mL) a partir da eluição do padrão blue dextran 2000 (anexo F), e os volumes de eluição dos quatro padrões de massa molar (ferritina 9,58 mL; conalbumina 13,92 mL; anidrase carbônica 15,86 mL e ribonuclease A 19,07 mL) (anexo G). A partir destes dados, calculou-se o constante de distribuição (K_{av}) de cada padrão e plotou-se o gráfico de calibração da coluna (gráfico 8), cuja equação da reta foi K_{av} = - 0,3798 $\log_{MM}$ + 2,2253. Através desta equação, calcularam-se as massas molares relativas dos três picos de cada cromatograma (tabela 11).

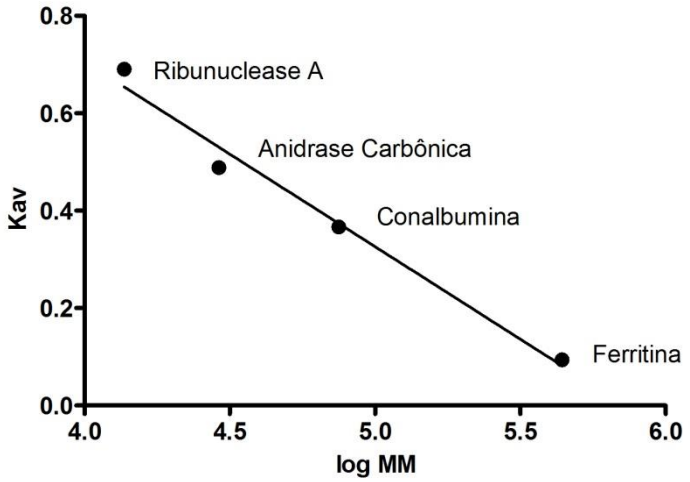


Gráfico 8 – Curva de calibração da coluna cromatográfica de exclusão molecular Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Life Sciences). Para determinação do volume morto foi utilizado o padrão *blue dextran 2000* (*GE Healthcare Life Sciences*), em eluição separada. Os demais padrões foram eluídos na mesma corrida: ferritina (440 kDa), conalbumina (75 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e ribonuclease A (13,7 kDa), todos da *GE Healthcare Life Sciences*. Ambas eluições foram realizadas em FPLC ÄKTA *Purifier* (*GE Healthcare Life Sciences*), de maneira isocrática, com tampão Tris-HCl 50 mM e glicina 100 mM, pH 8,6, fluxo de 1 mL/min e monitoramento a 280 nm.

Tabela 11 – Volumes de eluição e massas molares relativas dos picos nos cromatogramas de exclusão molecular

	Volumes de Eluição [a]			Massa Molar Relativa (kDa)		
Amostras	**Pico 1** [b]	**Pico 2**	**Pico 3**	**Pico 1** [b]	**Pico 2**	**Pico 3**
EcA II selvagem	12,36	13,70	14,80	142	85	56
K22R	12,48	13,68	14,72	135	86	58
V154M	12,28	13,66	14,78	146	87	56
T161I	12,41	13,70	14,88	139	85	54
Q190L	12,27	13,69	14,76	147	86	57
P40S/S206C	12,04	13,60	14,64	160	89	59
T80M/K139N	12,10	13,59	14,72	156	89	58

[a] Os valores apresentados são a média de três à seis eluições de um mesma amostra.
[b] Através de SDS-Page, foi constatada a presença de L-asparaginase pura no pico 1

Pode-se constatar que, apesar de alguma flutuação nos dados (135 a 160 kDa), a massa molar relativa para todas as L-asparaginases obtidas está próxima à massa molar calculada para o tetrâmero (34 kDa x 4 = 136 kDa). A flutuação nos dados pode ter sido ocasionada por pequenas diferenças nas dimensões do tetrâmero, ocasionadas por alterações no grau de compactação ou de hidratação da molécula. Contudo, seriam necessárias replicatas biológicas para comprovar se a flutuação de dados constatada se mantém e se é significativa, ou se seria apenas um erro do método.

5.6 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A enzima EcA II selvagem e as enzimas mutantes, após a purificação (frações 7, 8 e 9 da exclusão molecular), foram submetidas à caracterização enzimática, conforme descrito em 4.6. Os valores obtidos estão resumidos nas tabelas 12 a 15, e as cinéticas representadas nos gráficos 9 e 10.

A tabela 12 traz as atividades específicas, tanto asparaginásica quanto glutaminásica, para a EcA II selvagem e seus mutantes. A atividade específica asparaginásica foi realizada por dois métodos distintos: Nessler (item 4.2.3.6) e ensaio acoplado à GDH (item 4.6.1). Já a atividade específica glutaminásica foi realizada apenas pelo ensaio acoplado à GDH. Como esperado, houve diferença dentre os valores de atividade asparaginásica obtidos pelo método de Nessler e pelo

ensaio acoplado à GDH, devido às diferenças nas sensibilidades de cada método. Esta diferença foi cerca de 4 vezes para todas as enzimas testadas.

O ensaio de Nessler foi realizado em oito tempos distintos, de 2 a 16 min, e, para todas as enzimas testadas, o melhor tempo de reação foi de 10 min, resultando nos valores apresentados na tabela 12.

Tabela 12 – Atividades Específicas Asparaginásica e Glutaminásica

Enzimas	**Ativ Esp Asn Nessler ** (U/mg)**	**Ativ Esp Asn Ensaio Acoplado a GDH (U/mg)**	**Ativ Esp Gln Ensaio Acoplado a GDH (U/mg)**	**Percentual de atividade Gln (%)**
EcA II selvagem *	78,2 ± 3,4	381,8 ± 19,0	5,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1
K22R *	80,6 ± 2,9	350,9 ± 8,7	6,5 ± 0,2	1,9 ± 0,1
V154M *	93,5 ± 3,1	320,9 ± 10,2	5,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1
T161I *	96,1 ± 4,7	345,9 ± 11,3	6,0 ± 0,3	1,7 ± 0,1
Q190L *	97,8 ± 2,4	446,9 ± 11,7	6,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1
P40S/S206C *	71,0 ± 1,4	219,2 ± 5,8	4,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1
T80M/K139N *	82,8 ± 2,4	308,7± 12,9	6,3 ± 0,3	2,0 ± 0,2

Ativ Esp: atividade específica; **GHD:** glutamato desidrogenase * As análises foram feitas em triplicata. ** Os resultados apresentados são do tempo de reação de 10 min.

Conforme apresentado na tabela 12, o valor da atividade específica L-asparaginásica da EcA II selvagem e dos mutantes K22R, V154M, T161I e T80M/K139N está dentro do descrito na literatura para a EcA II selvagem – de 280 a 400 U/mg, segundo Narta, Kanwar e Azmi (2007) – considerando-se os valores obtidos no ensaio acoplado a GDH. Embora os mutantes Q190L e P40S/S206C apresentem alguma variação neste valor (446,9 ± 11,7 e 219,2 ± 5,8 U/mg, respectivamente), considerou-se que esta não foi significativa, levando-se em conta que não foram realizadas replicatas biológicas, as quais possivelmente elevariam o desvio padrão dos valores. Da mesma forma, houve homogeneidade dentre os valores da atividade específica glutaminásica obtidos (CV% = 16%), culminando em um percentual de atividade glutaminásica também homogênio (CV% = 14%), e dentro do descrito na literatura – de 1 a 2%, segundo Derst, Henseling e Röhm, (2000) e Labrou et al. (2010).

A respeito do duplo mutante P40S/S206C, o qual apresentou a menor atividade específica glutaminásica (4,0 ± 0,1 U/mg), este também apresentou a menor atividade específica asparaginásica (219,2 ± 5,8 U/mg), de modo que a relação entre as duas atividades (1,8 ± 0,1 %) foi maior do que a da EcA II selvagem (1,4 ± 0,1 %). Sendo assim, o objetivo de se obter uma enzima com menor atividade

glutaminásica não foi atendido por nenhum dos seis mutantes – ainda que, na análise *in silico* (item 5.4.2.2), os mutantes K22R, Q190L e T161I tenham sido preditos como possíveis candidatos a atingirem esse objetivo. A menor relação percentual entre as duas atividades foi a da própria EcA II selvagem.

Também não constituiu vantagem o mutante Q190L, o qual, apesar de ter apresentado uma atividade específica asparaginásica relativamente maior (446,9 ± 11,7 U/mg) também apresentou uma atividade específica glutaminásica maior em relação ao padrão (6,1 ± 0,1 U/mg *versus* 5,4 ± 0,2 U/mg), de modo que a relação entre as duas atividades se manteve idêntica ao padrão (1,4 ± 0,1%).

A homogeneidade entre as atividades específicas se reforça nos valores das cinéticas (tabelas 13 e 14), realizadas pelo método acoplado à GDH, conforme detalhado posteriormente.

Tabela 13 – Caracterização cinética da atividade L-asparaginásica

Enzimas	$k_{0,5}$ (µM)	Número de Renovação k_{cat} (s^{-1})	Constante de Especificidade $k_{cat}/k_{0,5}$ (s^{-1} M^{-1})	Coeficiente de Hill n_H [a]	r^2 [b]
EcA II selvagem **	32,7 ± 10,2	172,9 ± 4,3	5,3 (± 2,0) x10^6	2,0 ± 0,2	0,923
K22R **	30,3 ± 11,7	171,6 ± 5,0	5,7 (± 2,8) x 10^6	2,0 ± 0,2	0,880
V154M **	27,7 ± 6,0	136,6 ± 2,1	4,9 (± 1,2) x 10^6	2,0 ± 0,1	0,961
T161I *	23,1 ± 3,6	149,1 ± 1,5	6,4 (± 1,1) x 10^6	2,4 ± 0,1	0,991
Q190L *	48,0 ± 7,0	171,7 ± 2,2	3,6 (± 0,6) x 10^6	1,9 ± 0,1	0,989
P40S/S206C *	40,1 ± 4,8	148,1 ± 1,5	3,7 (± 0,5) x 10^6	1,7 ± 0,1	0,992
T80M/K139N *	22,6 ± 4,7	166,8 ± 2,3	7,4 (± 1,7) x 10^6	2,1 ± 0,1	0,983

[a] O coeficiente de Hill (n_H) frente a asparagina caracteriza a cinética como alostérica para todas as enzimas testadas. [b] O valor de r^2 demonstra a adequabilidade do modelo matemático alostérico sigmoidal aos dados experimentas, sendo que, quanto mais próximo de 1, mais adequado é o modelo. * As análises foram feitas em triplicata. ** As análises foram feitas em sextuplicata.

Tabela 14 – Caracterização cinética da atividade L-glutaminásica

Enzimas	k_M (mM)	Número de Renovação k_{cat} (s^{-1})	Constante de Especificidade k_{cat}/k_M (s^{-1} M^{-1})	Coeficiente de Hill n_H [a]	r^2 [b]
EcA II selvagem **	4,3 ± 0,6	4,6 ± 0,25	1,1 (± 0,21) x10^3	1,0 ± 0,16	0,852
K22R*	3,7 ± 0,2	3,9 ± 0,06	1,0 (± 0,07) x10^3	1,1 ± 0,06	0,983
V154M **	3,1 ± 0,2	2,2 ± 0,05	0,7 (± 0,07) x10^3	0,9 ± 0,08	0,957
T161I *	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,02	1,1 (± 0,03) x10^3	1,0 ± 0,03	0,996
Q190L *	2,8 ± 0,1	2,6 ± 0,02	0,9 (± 0,03) x10^3	1,0 ± 0,03	0,996
P40S/S206C *	3,7 ± 0,1	2,6 ± 0,03	0,7 (± 0,03) x10^3	1,0 ± 0,04	0,993
T80M/K139N *	2,7 ± 0,1	3,5 ± 0,03	1,3 (± 0,05) x10^3	0,9 ± 0,03	0,994

[a] O coeficiente de Hill (n_H) frente a glutamina caracteriza a cinética como michaeliana para todas as enzimas testadas. [b] O valor de r^2 demonstra a adequabilidade do modelo matemático Michaelis-Menten aos dados experimentas, sendo que, quanto mais próximo de 1, mais adequado é o modelo. * As análises foram feitas em triplicata. ** As análises foram feitas em sextuplicata.

Curiosamente, apesar da EcA II ter sido historicamente descrita como uma enzima michaeliana (CAPPELLETTI et al., 2008; BOREK et al., 2014; LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010; DERST; HENSELING; RÖHM, 2000), no estudo da cinética asparaginásica da EcA II selvagem e de todos os mutantes, o modelo matemático alostérico sigmoidal foi significantemente mais adequado ao descrever os dados experimentais do que o modelo de Michaelis Menten (probabilidade menor do que 10^{-4} para a hipótese do modelo ser Michaelis Menten), com coeficientes de Hill (n_H) entre 1,7 e 2,4 (tabela 13 e gráficos 9A à 9G). Já no estudo da cinética glutaminásica, o modelo matemático mais adequado aos dados de todas as enzimas foi o michaeliano, com n_H entre 0,9 e 1,1 (tabela 14 e gráficos 10A à 10G).

Estes resultados são corroborados por uma pesquisa recentemente publicada, a qual também descreve a EcA II como alostérica sigmoidal frente à asparagina (n_H de 1,5 ± 0,1) e michaeliana frente à glutamina (n_H 1,1 ± 0,1). Segundo os autores, esta diferença na cooperatividade sugere que possam ocorrer diferentes modificações sutis na estrutura global da enzima, dependendo do tipo de substrato ligado (ANISHKIN et al 2015). Anteriormente a esta pesquisa, o comportamento alostérico sigmoidal frente a L-asparagina havia sido descrito para L-asparaginases do tipo I, dentre elas a EcA I e a L-asparaginase I humana (HsA I). Nestas duas enzimas, a cooperatividade foi fortemente positiva (n_H de 3,5 ± 0,3 para EcA I e 3,9 ± 0,2 para HsA I) e modulada pela própria L-asparagina, através da ligação desta a um sítio alostérico diferente do sítio catalítico (KARAMITROS; KONRAD, 2014; YUN et al, 2007). Recentemente, outros dois trabalhos com a L-asparaginase II de *Helicobacter pylori* descreveram comportamento alostérico perante a glutamina (n_H 2 ± 0,1), mas michaeliano perante à asparagina (n_H 1 ± 0,06) (MAGGI et al., 2015; CAPPELLETTI et al., 2008)

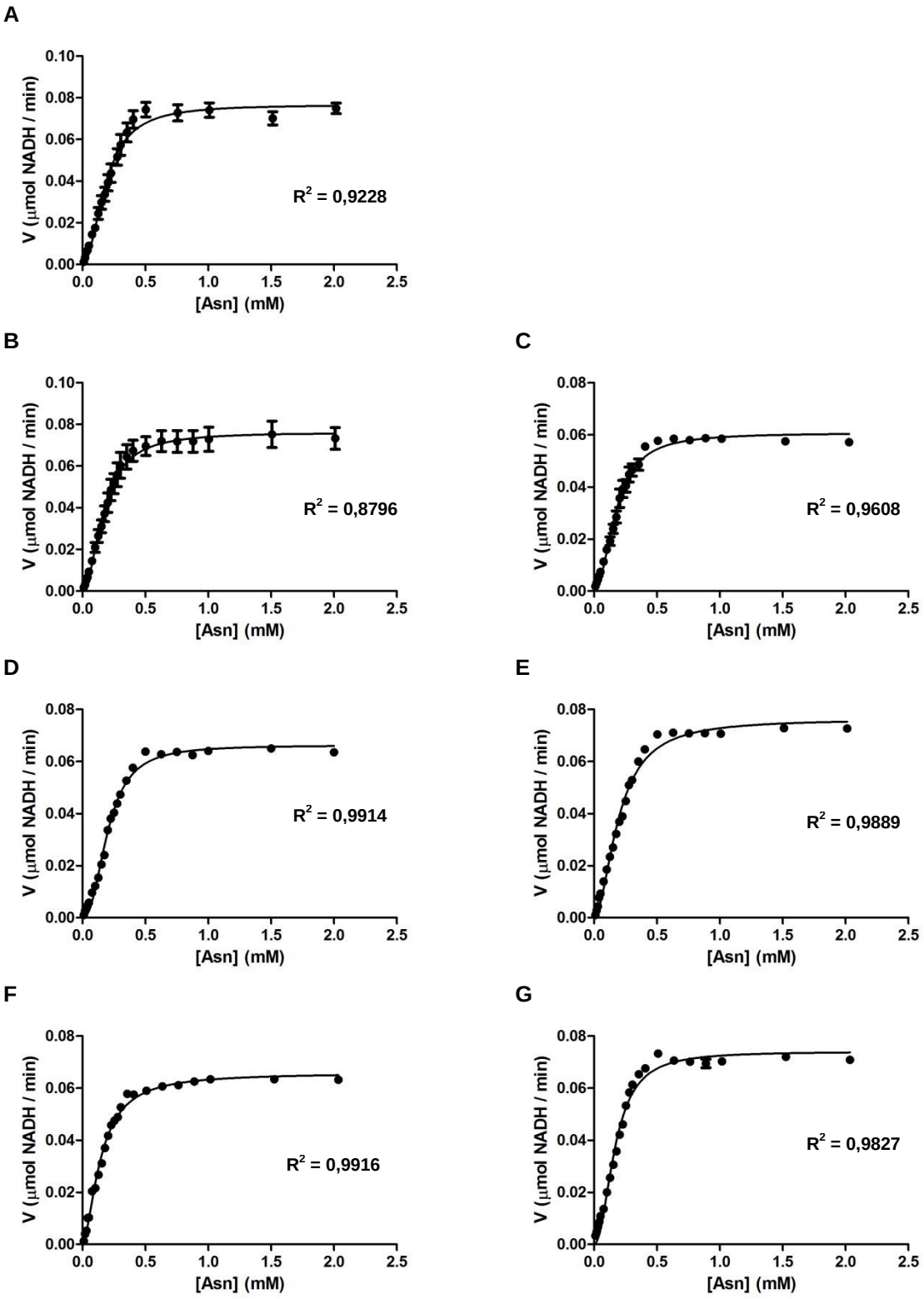


Gráfico 9 – Caracterização cinética da atividade asparaginásica da **(A)** EcA II selvagem e das mutantes **(B)** K22R, **(C)** V154M, **(D)** T161I, **(E)** Q190L, **(F)** P40S/S206C e **(G)** T80M/K139N, realizada pelo ensaio acoplado à GDH (item 4.6.1), como monitoramento em tempo real da oxidação do NADH. Cada molécula de NADH oxidado equivale à hidrólise de uma molécula de asparagina. Em todos os ensaios, utilizou-se de 0,01 a 2,00 mM de asparagina e 20 nM de L-asparaginase. Para todas as enzimas o perfil cinético foi alostérico sigmoidal, com n_H de **(A)** 2,0 ± 0,2, **(B)** 2,0 ± 0,2, **(C)** 2,0 ± 0,1, **(D)** 2,4 ± 0,1, **(E)** 1,9 ± 0,1, **(F)** 1,7 ± 0,1, e **(G)** 2,1 ± 0,1. Ensaios A, B e C realizados em sextuplicata; demais ensaios realizados em triplicata.

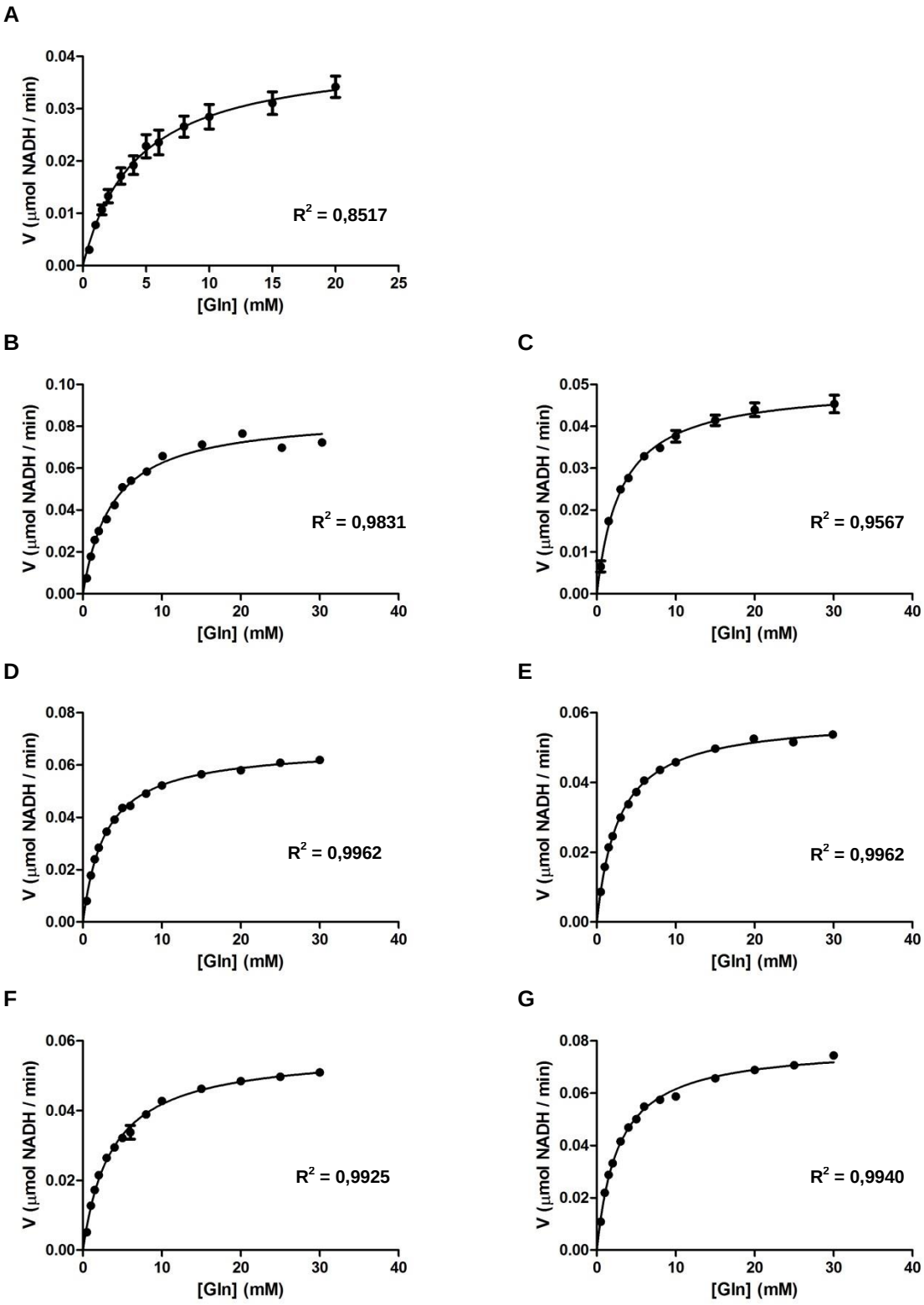


Gráfico 10 – Caracterização cinética da atividade glutaminásica da **(A)** EcA II selvagem e das mutantes **(B)** K22R, **(C)** V154M, **(D)** T161I, **(E)** Q190L, **(F)** P40S/S206C e **(G)** T80M/K139N, realizada pelo ensaio acoplado à GDH (item 4.6.1), como monitoramento em tempo real da oxidação do NADH. Cada molécula de NADH oxidado equivale a hidrólise de uma molécula de glutamina. No ensaio (A) utilizou-se 400 nM da EcA II selvagem; nos demais ensaios utilizou-se 1000 nM de L-asparaginase. Para todas as enzimas o perfil cinético michaeliano, com n_H de **(A)** 1,0 ± 0,16, **(B)** 1,1 ± 0,06, **(C)** 0,9 ± 0,08, **(D)** 1,0 ± 0,03, **(E)** 1,0 ± 0,03, **(F)** 1,0 ± 0,04, e **(G)** 0,9 ± 0,03. Ensaios A e C realizados em sextuplicata; demais ensaios realizados em triplicata.

A respeito dos outros parâmetros cinéticos, conforme afirmado anteriormente, estes confirmam a relativa homogeneidade de valores das atividades específicas. Na cinética asparaginásica (tabela 13), por exemplo, para todas as amostras, o valor de $k_{0,5}$ está na faixa de micromolar (entre 22,6 ± 4,7 e 48,0 ± 7,0 µM), e o número de renovação (k_{cat}) por volta de 10^2 s^{-1} (entre 136,6 ± 2,1 e 172,9 ± 4,3 s^{-1}), resultando em uma constante de especificidade ($k_{cat}/k_{0,5}$) de cerca de 10^6 s^{-1} M^{-1} (entre 3,6 e 7,4 x 10^6 s^{-1} M^{-1}). Estes valores de $k_{0,5}$ e $k_{cat}/k_{0,5}$ estão bastante próximos aos relatados anteriormente por Anishkin et al. (2015) e por Derst, Henseling e Röhm (2000), para os quais o $k_{0,5}$ (ou k_M) seria de 18 ± 2 e 15 ± 2 µM e o $k_{cat}/k_{0,5}$ (ou k_{cat}/k_M) seria de 3,3 x 10^6 e 1,6 x 10^6 s^{-1} M^{-1}, respectivamente. Já os valores encontrados de k_{cat} estão relativamente superiores aos destes autores, respectivamente 60 ± 7 e 24 ± 1 s^{-1}.

Já na cinética glutaminásica (tabela 14) os valores de k_M obtidos estão na faixa de milimolar (de 2,7 ± 0,1 a 4,3 ± 0,6 mM), o k_{cat} está entre 2,2 ± 0,05 e 4,6 ± 0,25 s^{-1}, e o k_{cat}/k_M cerca de 10^3 s^{-1} M^{-1} (entre 0,7 ± 0,07 e 1,3 ± 0,05 x 10^3 s^{-1} M^{-1}). Dentre estes valores, apenas o valor de k_M foi similar ao encontrado pelos dois grupos citados (ANISHKIN et al., 2015; DERST; HENSELING; RÖHM, 2000): 1,6 ± 0,4 e 3,5 ± 0,5 mM, respectivamente. Já os valores de k_{cat} e k_{cat}/k_M estiveram de acordo apenas com o trabalho de Anishkin et al. (2015) – 2,2 ± 0,3 s^{-1} e 1,4 x 10^3 s^{-1} M^{-1}, respectivamente – sendo cerca de dez vezes superiores aos valores de Derst, Henseling e Röhm (2000) – 0,3 ± 0,02 s^{-1} e 9,4 x 10^1 s^{-1} M^{-1}, respectivamente.

Conforme levantado por Anishkin et al. (2015), esta diferença no número de renovação e na especificidade para a glutamina, em relação ao trabalho de Derst, Henseling e Röhm (2000), se justifica devido a este ter utilizado a temperatura reacional de 25 ºC, enquanto naquele e no presente trabalho, a temperatura reacional utilizada foi de 37 ºC. Outro fator que também pode ter influenciado esta diferença é o pH utilizado: nesta dissertação (pH 8,0) e no trabalho de Anishkin et al. (2015) (pH 8,5), este esteve na faixa do pH ótimo EcA II selvagem (pH 8,0 à 9,0, segundo Bahreni et al., 2014), enquanto o pH utilizado por Derst, Henseling e Röhm (2000) foi de 7,0. Curiosamente, estes fatores impactaram o k_{cat} e $k_{cat}/k_{0,5}$ (ou k_{cat}/k_M) da cinética asparaginásica em uma dimensão bem mais sutil, sendo os valores de Anishkin et al. (2015) cerca de apenas 2 vezes os valores de Derst, Henseling e Röhm (2000).

Por fim, a razão entre as constantes de especificidade para a asparagina e para a glutamina variou entre 3800 ± 700 e 7000 ± 2300 (tabela 15), significando que a enzima favorece a degradação da asparagina frente à glutamina por um fator médio de 5700 vezes. Também não houve diferenças significativas entre as razões dos mutantes em relação à razão da EcA II selvagem (5200 ± 3000), a qual foi equivalente à de 2400, obtida por Anishkin et al. (2015), mas inferior à de 17000, obtida por Derst, Henseling e Röhm (2000).

Tabela 15 – Razão entre as constantes de especificidade para Asparagina e Glutamina da EcA II selvagem e seus mutantes

Enzimas	**Razão entre $k_{cat}/k_{0,5}$ (s^{-1} M^{-1}) para asparagina e k_{cat}/k_M (s^{-1} M^{-1}) para glutamina**
EcA II selvagem	$5,2 \pm 3,0 \times 10^3$
K22R	$6,2 \pm 3,2 \times 10^3$
V154M	$7,0 \pm 2,3 \times 10^3$
T161I	$6,2 \pm 1,2 \times 10^3$
Q190L	$3,8 \pm 0,7 \times 10^3$
P40S/S206C	$5,3 \pm 0,9 \times 10^3$
T80M/K139N	$5,9 \pm 1,6 \times 10^3$

5.7 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À CLIVAGEM PROTEOLÍTICA

A figura 8 e a tabela 16 mostram o resultado da avaliação da resistência à clivagem proteolítica, descrita no item 4.7.

Tabela 16 – Resistência frente às proteases sanguíneas humanas da EcA II selvagem e seus mutantes

Enzimas	**Resistência à incubação***	**Resistência à CTSB**	**Resistência à AEP**
EcA II selvagem	S	SS	SS
K22R	S	SS	SS
V154M	S	SS	SS
T161I	RR	RR	SS
Q190L	RR	RR	RR
P40S/S206C	RR	RR	RR
T80M/K139N	RR	SS	SS

S = pouco sensível (é possível visualizar a banda original na faixa de 34 kDa, acompanhada de uma banda abaixo desta faixa); SS = muito sensível (banda prevalente abaixo da faixa de 34 kDa acompanhada de banda original sutil na faixa de 34 kDa); RR = completamente resistente (única banda visível está na faixa de 34 kDa). *Algumas enzimas foram parcialmente sensíveis mesmo na ausência de qualquer protease.

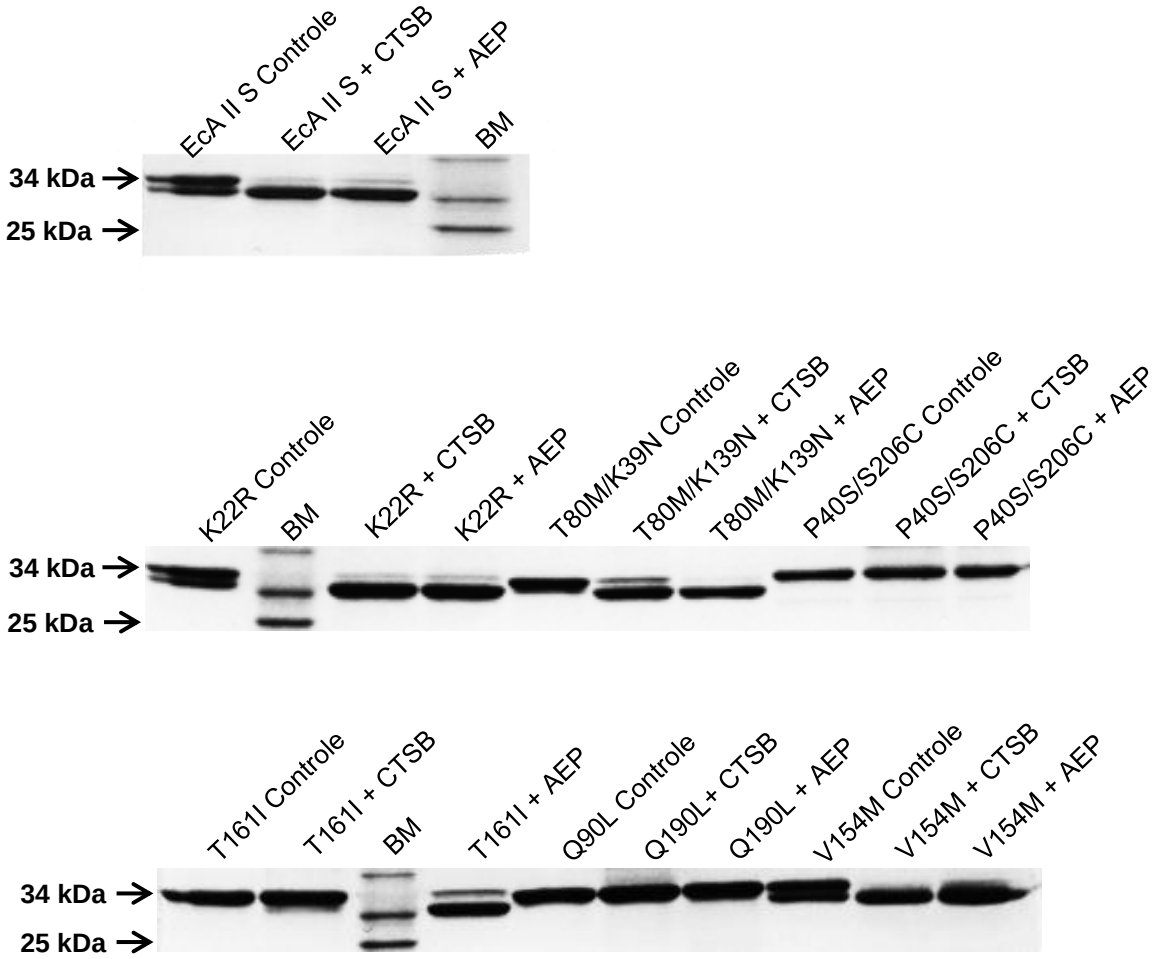


Figura 8 - Resultado da susceptibilidade da EcA II selvagem e dos mutantes após a incubação com as proteases CTSB e AEP. Cada coluna refere-se a um ensaio individual. Cada ensaio foi realizado com 4 µg de L-asparaginase pura e 20 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,8, e incubado à 37 ºC por 120 horas. Nos ensaios "controle" nenhuma protease foi adicionada. Nos ensaios "AEP" e "CTSB" foram adicionados 2 µg de cada uma destas proteases humanas recombinantes (Abcam). Nas colunas "BM" foram aplicados 5 µL do padrão de massa molecular BenchMark Protein Ladder (Invitrogen). A figura refere-se ao resultado da SDS-Page realizado com 10 µL de cada ensaio após o tempo de incubação.

Nesta figura 8, conforme resumido na tabela 16, pode-se notar claramente que a EcA II selvagem e os mutantes K22R, T80M/K139N e V154M foram clivados pelas duas proteases, CTSB e AEP, levando às bandas significativas em uma faixa de menor massa molar (~ 30 kDa). Mesmo os controles da EcA II selvagem e dos mutantes K22R e V154M, na ausência de qualquer adição de protease, foram parcialmente clivados, mostrando a labilidade destas enzimas à exposição prolongada à 37 ºC ou contaminantes. Na presença das proteases, contudo, a

clivagem destes foi muito mais expressiva, e apenas uma banda sutil aparece na faixa de 34 kDa, referente à proteína não clivada.

Já os mutantes P40S/S206C e Q190L foram resistentes às duas proteases – AEP e CTSB – enquanto o mutante T161I foi resistente apenas à CTSB. O controle destes três mutantes (*i. e.,* incubados sem qualquer protease) também foram mais resistentes do que a EcA II selvagem.

Interessante notar que resistência à AEP não havia sido predita para nenhum mutante (item 5.4.2.3), uma vez que nenhum deles modificou um resíduo de asparagina ou de aspartato. Contudo, dois mutantes (P40S/S206C e Q190L) apresentaram resistência a esta protease.

No duplo mutante P40S/S206C, acredita-se que a serina, incluída na posição 40, possa ter aumentado a flexibilidade daquela região, uma vez que a cadeia lateral rígida das prolinas reduz a flexibilidade. Este aumento de flexibilidade pode ter dificultado o acesso da AEP ao seu resíduo alvo N24, o qual, na estrutura quartenária, está relativamente próximo ao resíduo P40 do dímero adjacente (N24 do monômero A próximo ao P40 do monômero B, e *vice versa*). Segundo Patel et al. (2009), o sítio catalítico da AEP está localizado em um sulco profundo, enquanto o resíduo N24 da EcA II está localizado em uma superfície convexa, de tal maneira que uma região complementa a outra, e faz deste resíduo o primeiro a ser clivado pela AEP. Curiosamente, o resíduo P40 foi o único, dentre os resíduos mutados, largamente conservado evolutivamente (item 5.4.2.4), o que indica que possivelmente a prolina tenha importância nesta posição.

Já a respeito do resíduo Q190L, o possível efeito deste na resistência à AEP não está claro. Contudo, conforme levantado em 5.4.2.2, esta mutação pode ter levado a uma maior compactação do tetrâmero, devido a possível interação da leucina com a vizinhança hidrofóbica. É possível que esta maior compactação também tenha diminuído o acesso da AEP ao resíduo N24.

A respeito da resistência à CTSB, esta foi obtida nos mutantes P40S/S206C, T161I e Q190L. No primeiro mutante (P40S/S206C), esta resistência já havia sido predita (item 5.4.2.3), visto que a mutação S206C leva à extinção de um dos sítios preditos mais expostos à superfície da EcA II, o ^{202}PFDV.SK^{207}. É válido lembrar que não há estudos prévios que tenham definido experimentalmente os sítios reais de clivagem pela CTSB, e os sítios apresentados nesta dissertação foram apenas

preditos *in silico*. A resistência à CTSB, encontrada no mutante P40S/S206C, é um indício de que o sítio predito ^{202}PFDV.SK^{207} seja um sítio real de clivagem pela CTSB, fazendo-se necessários, porém, outros experimentos, como a obtenção de um mutante único S206C, e o sequenciamento amino-terminal dos peptídeos fragmentados na EcA II selvagem.

A respeito dos outros dois mutantes (T161I e Q190L) que foram resistentes à CTSB, estes não extinguiram nenhum sítio de clivagem predito *in silico* (item 5.4.2.3), tendo o T161I ao contrário criado um sítio novo – porém interno, e, portanto, provavelmente inacessível à protease. Acredita-se que a resistência à CTSB gerada por estes dois mutantes tenha sido devida a possível maior compactação que eles podem ter ocasionado na molécula, conforme discutido anteriormente neste item e em 5.4.2.2.

Vale ressaltar que ainda são escassos os trabalhos na literatura que relacionam a L-asparaginase às proteases AEP e CTSB. De fato, foram encontrados apenas dois trabalhos cujo escopo principal é esta interação: Patel et al. (2009) e Meer et al. (2014). Portanto, pouco se sabe dos efeitos que L-asparaginases com diferentes graus de resistência a estas proteases poderiam ocasionar nos pacientes tratados.

A princípio, acredita-se que a maior resistência às proteases pelos mutantes T161I, Q190L e P40S/S206C elevariam o tempo de meia vida destas enzimas no organismo humano, trazendo benefícios ao paciente tratado, por possibilitar uma menor frequência de aplicações da enzima, a qual, nos protocolos atuais, é de três vezes por semana (SHRIVASTAVA et al, 2015). Além disso, os mutantes citados poderiam ser menos imunogênicos, visto que a clivagem da EcA II pelas proteases pode também estar associada a uma maior exposição dos epítopos imunogênicos desta enzima (PATEL et al., 2009).

Contudo, o aumento excessivo no tempo de meia vida de um biofármaco pode ocasionar severo aumento nos efeitos adversos deste, conforme citado por Meer et al. (2014). É possível que ambas a AEP e a CTSB sejam primordiais para a degradação e posterior depuação renal da EcA II. Assim sendo, torna-se evidente a necessidade de estudos cautelosos a respeito da farmacocinética desta interação entre a L-asparaginase e as próteses sanguíneas humanas.

6. CONCLUSÕES

Através de mutações randômicas produzidas por epPCR, foram obtidos seis mutantes (0,5%) com atividade equivalente à do padrão, sendo eles: K22R, V154M, T161I, Q190L, P40S/S206C e T80M/K139N.

Todos os mutantes obtidos apresentaram valores de atividade asparaginásica e glutaminásica semelhantes aos valores da EcA II selvagem (cerca de 382 ± 19 U/mg e 5,4 ± 0,2 U/mg, respectivamente), culminando em um percentual de atividade glutaminásica também semelhante (de 1,4 a 2%) e dentro do descrito na literatura (DERST; HENSELING; RÖHM, 2000; LABROU et al., 2010). Com isso, o objetivo de se obter um mutante com menor atividade glutaminásica não foi alcançado.

Um fato interessante a ser destacado é que todas as enzimas testadas apresentaram comportamento alostérico sigmoidal (n_H ~ 2,0) frente à asparagina, contradizendo grande parte da literatura, que descreve a EcA II como michaeliana (CAPPELLETTI et al., 2008; BOREK et al., 2014; LABROU; PAPAGEORGIOU; AVRAMIS, 2010; DERST; HENSELING; RÖHM, 2000). Pelo conhecimento do grupo, o único trabalho que corrobora com este resultado da EcA II apresentar comportamento alostérico sigmoidal frente à asparagina é o recém-publicado por Anishkin et al. (2015).

Quanto ao ensaio de resistência à clivagem proteolítica, um mutante foi resistente apenas à CTSB (T161I) e dois foram resistentes a ambas CTSB e AEP (Q190L e P40S/S206C). Este aumento de resistência pode ser benéfico em um futuro biofármaco, pois pode levar ao aumento do tempo de meia vida deste, reduzindo a frequência de doses necessárias. Contudo, o aumento no tempo de meia vida pode também implicar em um aumento de toxicidade, e os benefícios devem ser avaliados com cautela em futuros estudos farmacocinéticos e toxicológicos. Os resultados de resistência à clivagem proteolítica serão publicados em artigo científico, o qual está sendo elaborado.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, serão necessários novos estudos *in vitro* com o mutante T161I, resistente à clivagem proteolítica pela CTSB, e com os mutantes Q190L e P40S/S206C, resistentes à clivagem proteolítica pela CTSB e AEP, e também com os simples mutantes P40S e S2016C. Entre estes estudos, sugere-se a incubação destes mutantes com sangue humano, de modo a mimetizar melhor o ambiente de clivagem.

Quanto a possível futura aplicação clínica dos mutantes obtidos, sugere-se a caracterização inicial destes mutantes quanto à citotoxicidade deles tanto em células saudáveis (por exemplo, HEK 2), quanto em células leucêmicas (por exemplo, MOLT-4, REH e Sup-B15). Posteriormente, em futuros estudos com cobaias, atenta-se para um possível aumento de toxicidade, se forem mantidas as mesmas doses da enzima selvagem, devido a uma possível diminuição da depuração renal desta.

Por fim, tendo em vista que existem poucos estudos com as proteases CTSB e AEP frente à EcA II, sugere-se que seja realizado sequenciamento amino-terminal das frações clivadas na EcA II selvagem e nos mutantes sensíveis, para que se estabeleça o(s) sítio(s) de clivagem pela CTSB e pela AEP. Quanto aos mutantes resistentes, acredita-se que estudos de dinâmica molecular poderiam ser úteis para explicar-se o motivo da resistência obtida, conhecimento este que poderia gerar outros mutantes com o mesmo propósito.

REFERÊNCIAS[4]

AGGARWAL, N.; SLOANE, B. F. Cathepsin B: Multiple roles in cancer. **Proteomics Clinical Applications**, v. 8, p. 427–437. 2014

AGILENT TECHNOLOGIES. **GeneMorph II Random Mutagenesis Kit - Instruction Manual.** Catalog #200550. Revision B.01. 2014.

ANISHKIN, A. et al. Catalytic Role of the Substrate Defines Specificity of Therapeutic L-Asparaginase. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, p. 2867–2885. 2015.

ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; SLUSARCZYK, H.; SCHUMERS, J.; HIRTZ, D. Directed evolution of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* for improved stability during entrapment in polyacrylamide. **FEBS Journal**, v. 273, p. 3938–3945. 2006.

ASSELIN, B.; RIZZARI, C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. **Leukemia & Lymphoma**, v. 56, n. 8, p 2273-2280**.** 2015.

BAHREINI, E. et al. An optimized protocol for overproduction of recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, p. 510–528. 2014.

BALCÃO, V. M. et al. Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 537-542. 2001.

BOREK, D. et al. Crystal structure of active site mutant of antileukemic L-asparaginase reveals conserved zinc-binding site. **FEBS Journal**, v. 281, n. 18, p.4097- 4111. 2014. *In press.*

BOYD, D.; MANOIL, C; BECKWITH, J. Determinants of membrane protein topology. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 84, p. 8525-8529. 1987.

[4] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

CAPPELLETTI, D. et al. *Helicobacter pylori* L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 377, p. 1222–1226. 2008;

CHAN, W. K. et al. The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. **Blood**, v. 123, n. 23, p. 3596-3606. 2014.

CHEN, S. H. et al. Genetic variations in GRIA1 on chromosome 5q33 related to asparaginase hypersensitivity. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 88, n. 2, p. 191-196. 2010.

CHENG, F.; ZHU, L.; SCHWANEBERG, L. Directed evolution 2.0: improving and deciphering enzyme properties. **Chemical Communications**, v. 51, p. 9760-9772. 2015.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

COSTA, I. M. **Produção, caracterização cinética e engenharia de proteína Asparaginase 1 de *Saccharomyces cerevisiae* para avaliação de seu uso como biofármaco.** 2015. 80p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-23112015-151341/>. Acesso em: 07 de janeiro de 2016.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. DeLano, Palo Alto, CA, 2002.

DERST, C.; HENSELING, J.; RÖHM, K. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. **Protein Science**, v. 9, p. 2009–2017. 2000.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus *Aspergillus nidulans.* **Journal of General Microbiology**, v. 98, p. 493-501. 1977

DUETZ, W. A. et al. Methods for Intense Aeration, Growth, Storage, and Replication of Bacterial Strains in Microtiter Plates. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 6, p 2641 – 2648. 2000

EHRMAN, M.; CEDAR, H.; SCHWARTZ, J. H. L-Asparaginase II of *Escherichia* coli – studies of the enzymatic mechanism of action. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 1, p. 88-94. 1971.

FERNANDEZ, C. A. et al. HLA-DRB1*07:01 is associated with a higher risk of asparaginase allergies. **Blood**, v. 124, n. 8, p. 1266-1276. 2014.

FU, Y. et al. Development of a thermally stable formulation for l-asparaginase storage in aqueous conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 8-14. 2015.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES. **Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit Product Booklet**. 2008.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES. **Gel Filtration Calibration Kits - Product booklet.** 2011.

GEN. Microbial and Cell Growth in Microtiter Plates: Turning Individual Wells from Microtiter Plates into High-Quality Mini-Reactors. **Genetic Engineering & Biotecnology News.** Tutorials. v. 26, n. 11, 2006. Disponível em: http://www.genengnews.com/gen-articles/microbial-and-cell-growth-in-microtiter-plates/1675/. Acesso em 7 de julho de 2014.

GERVAIS, D., FOOTE, N. Recombinant Deamidated Mutants of *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase Have Similar or Increased Activity Compared to Wild-Type Enzyme. **Molecular Biotechnology**, v. 56, p. 865-877. 2014.

GROSSOWICZ, N. et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 187, n. 1, p. 111-125. 1950.

HARMS, E et al. Construction of Expression Systems for *Escherichia coli* Asparaginase II and Two-Step Purification of the Recombinant Enzyme from Periplasmic Extracts. **Protein Expression and Purification**, v. 2, p. 144-150. 1991.

HINSON, A.; NEWBERN, D.; LINARDIC, C.M. Asparaginase-Induced Hypertriglyceridemia Presenting as Pseudohyponatremia during Leukemia Treatment. **Case Reports in Pediatrics**, v. 2014, article ID 635740, 5 pages. 2014. *Epub.* Disponível em: http://dx.doi.org/10.1155/2014/635740. Acesso em 02 de dezembro de 2014.

JIANHUA, C. et al. Probing the Antigenicity of *E. coli* L-Asparaginase by Mutational Analysis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, p. 57-65. 2006.

KANVAR, V. S. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, 16-Sep-2013. **Medscape Reference: Drugs, Diseases and Procedures.** *Web site*. Disponível em: http://emedicine.medscape.com/article/990113-overview#showall. Acesso em 17 de novembro de 2013.

KARAMITROS, C. A., KONRAD, M. Human 60-kDa Lysophospholipase Contains an N-terminal L-Asparaginase Domain That Is Allosterically Regulated by L-Asparagine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 19, p. 12962–12975. 2014

KENSY, F.; ENGELBRECHT, C.; BÜCHS, J. Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in Escherichia coli and *Hansenula polymorpha* fermentations. **Microbial Cell Factories**, v.8, n. 68. 2009

KENSY, F. et al. Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. **Microbial Cell Factories**, v.8, n. 31. 2009

KHUSHOO, A.; PAL, Y.; MUKHERJEE, K. L. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 68, p. 189-197. 2005.

KHUSHOO, A. et al. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. **Protein Expression & Purification**, v. 38, p. 29-36. 2004.

KIDROLASE: L-asparaginase. França: EUSA Pharma SAS, 2014. Bula de medicamento.

KOTZIA, G.; LABROU, N. Engineering thermal stability of L-asparaginase by in vitro directed evolution. **FEBS Journal,** v. 276, p. 1750–1761. 2009.

LABROU, N. E.; PAPAGEORGIOU, A. C.; AVRAMIS, V. I. Structure-Function Relationships and Clinical Applications of LAsparaginases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2183-2195. 2010

LABROU, N. E. Random Mutagenesis Methods for In Vitro Directed Enzyme Evolution. **Current Protein and Peptide Science**, v. 11, p. 91-100. 2010.

LIU, Y. H. et al., Improvement of the acid stability of *Bacillus licheniformis* alpha amylase by error-prone PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 541-549. 2012.

MAGGI et al. Engineering of *Helicobacter pylori* LAsparaginase: Characterization of Two Functionally Distinct Groups of Mutants. **PLOS One**, v. 10, n. 2. 2015.

MEENA, B. et al. Novel glutaminase free L-asparaginase from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 2, p. 373-388. 2015.

MEER, L. T. et al. A germ line mutation in cathepsin B points toward a role in asparaginase pharmacokinetics. **Blood**, v. 124, n. 19, p. 3027-3029. 2014.

MEHTA, R. K. et al. Mutations in Subunit Interface and B-cell Epitopes Improve Antleukemic Activities of *Escherichia coli* Asparaginase-II: Evaluation of Immunogenicity in Mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 3555-3570. 2014.

MULLIGHAN, C. G. The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia in children and young adults. **American Society of Hematology Education Program**, v. 1, p. 174-180. 2014

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 61, n.3, p. 208-221. 2007.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Dictionary of Cancer Terms**. Disponível em: http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms. Acesso em 29 de dezembro de 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª edição. Coordenação da tradução: Fabiana Horn. Porto Alegre: Artmed, 2011a. p. 183-227; 679-680

NELSON, D. L.; COX, M. M. Capítulo 6: Enzimas. *In:* **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª edição. Coordenação da tradução: Fabiana Horn. Porto Alegre: Artmed, 2011b.

NEW ENGLAND BIOLABS. **Restriction Endonucleases Technical Guide 2013/2014.**

NOVAGEN. Bacterial Protein Expression. In: **Novagen Catalog 2009/2010.**

NOVAGEN. **pET System Manual**, 11th edition. 2006.

NUSSBAUM, V.; LUBCKE, N.; FINDLAY, R. Hyperammonemia secondary to asparaginase: A case series. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 22, n. 1, p. 161-164. 2016.

OFFMAN, M. N. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. **Blood**, v. 117, n. 5, p.1614-1621. 2011.

PATEL, N. et al. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug l-asparaginase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 1964-1973. 2009.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia asparaginase*. **Cancer**, v. 117, n.2, p. 238-49. 2011.

POKROVSKAYA, M. V. Identification of functional regions in the *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase by site-directed mutagenesis. **Molecular Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 251-264. 2015.

PURWAHA, P. et al. Targeted metabolomic analysis of amino acid response to L-asparaginase in adherent cells. **Metabolomics**, v. 10, p. 909-919. 2014.

QIAGEN. **QIAprep® Miniprep Handbook**. 2012a

QIAGEN. **QIAGEN® Plasmid Purification Handbook.** 2012b

QIAGEN. Mentin Copan et al. **Chromatographic Purification and Separation Process for Mixtures of Nucleic Acids**. US 6.383.393 B1, 7 de maio de 2002.

RAMYA, L. N. et al. *In silico* Engineering of L-Asparaginase to Have Reduced Glutaminase Side Activity for Effective Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Pediatric Hematology-Oncology**, v. 33, n. 8, p. 617-621. 2011.

RASILA, T. S.; PAJUNEN, M.; SAVILAHTI, H. Critical evaluation of random mutagenesis by error-prone polymerase chain reaction protocols, *Escherichia coli* mutator strain, and hydroxylamine treatment. **Analytical Biochemistry**, v. 388, p. 71–80. 2009.

REINERT, R. et al. Role of glutamine depletion in directing tissue-specific nutrient stress responses to L-asparaginase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 31222-31233. 2006.

SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential asanticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. *Epub ahead of print.* Disponível em: http://www.croh-online.com/article/S1040-8428(15)00003-7/abstract. Acesso em 25 de fevereiro de 2015.

SIGMA ALDRICH. **Bradford Reagent Technical Bulletin**. 2013.

SIGMA-ALDRICH. **Enzymatic Assay of Asparaginase**. 1997.

SLUIS, I. et al. Efficacy and safety of recombinant *E. coli*-asparaginase in infants (less than one year of age) with acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 98, n. 11, p. 1697-1701. 2013.

STREFFORD, J. C., et al. Complex genomic alterations and gene expression in acute lymphoblastic leukemia with intrachromosomal amplification of chromosome 21. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 103, n. 21, p. 8167–8172. 2005.

SUDHIR, A. P. et al. Characterization of a Recombinant Glutaminase-Free L-Asparaginase (ansA3) Enzyme with High Catalytic Activity from *Bacillus licheniformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n.7, p. 2504-2415. 2014.

SWAIN, A. L. et al. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 90, n. 4, p. 1474–1478. 1993.

THERMO SCIENTIFIC. **10X T4 DNA Ligase Buffer Product Information**.2012.

VERMA, S. et al. Improvement of stability and enzymatic activity by site-directed mutagenesis of E. coli asparaginase II. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1844, p. 1219-1230. 2014.

VERSPURTEN, J. et al. SitePredicting the cleavage of proteinase substrates. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n. 7, p. 319-323. 2009.

VIDYA, J.; USHASREE, M. V.; PANDEY, A. Effect of surface charge alteration on stability of l-asparaginase II from *Escherichia sp*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 56, p. 15-19. 2014.

YU, H. et al. Improving the thermostability of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase by error-prone PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 279–285. 2009.

YUN, M. K. et al. Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic *Escherichia coli* L-Asparaginase I. **Journal of Molecular Biology**, v. 369, p. 794-811. 2007.

WAREPAM, M., SINGH, L. R. Osmolyte mixtures have different effects than individual osmolytes on protein folding and functional activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 573, p. 77-83. 2015.

WERNER, A.; RÖHM, K. H.; MÜLLER, H. J. Mapping of B-cell epitopes in *E. coli* asparaginase II, an enzyme used in leukemia treatment. **Biological Chemistry**, v. 386, p. 535–540. 2005.

WILSON, K.; WALKER, J. Chapter Five: Molecular Biology, Bioinformatics and Basic Tecniques. In: **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology.** 7th ed. Cambridge: Cambrige University Press, 2012a.

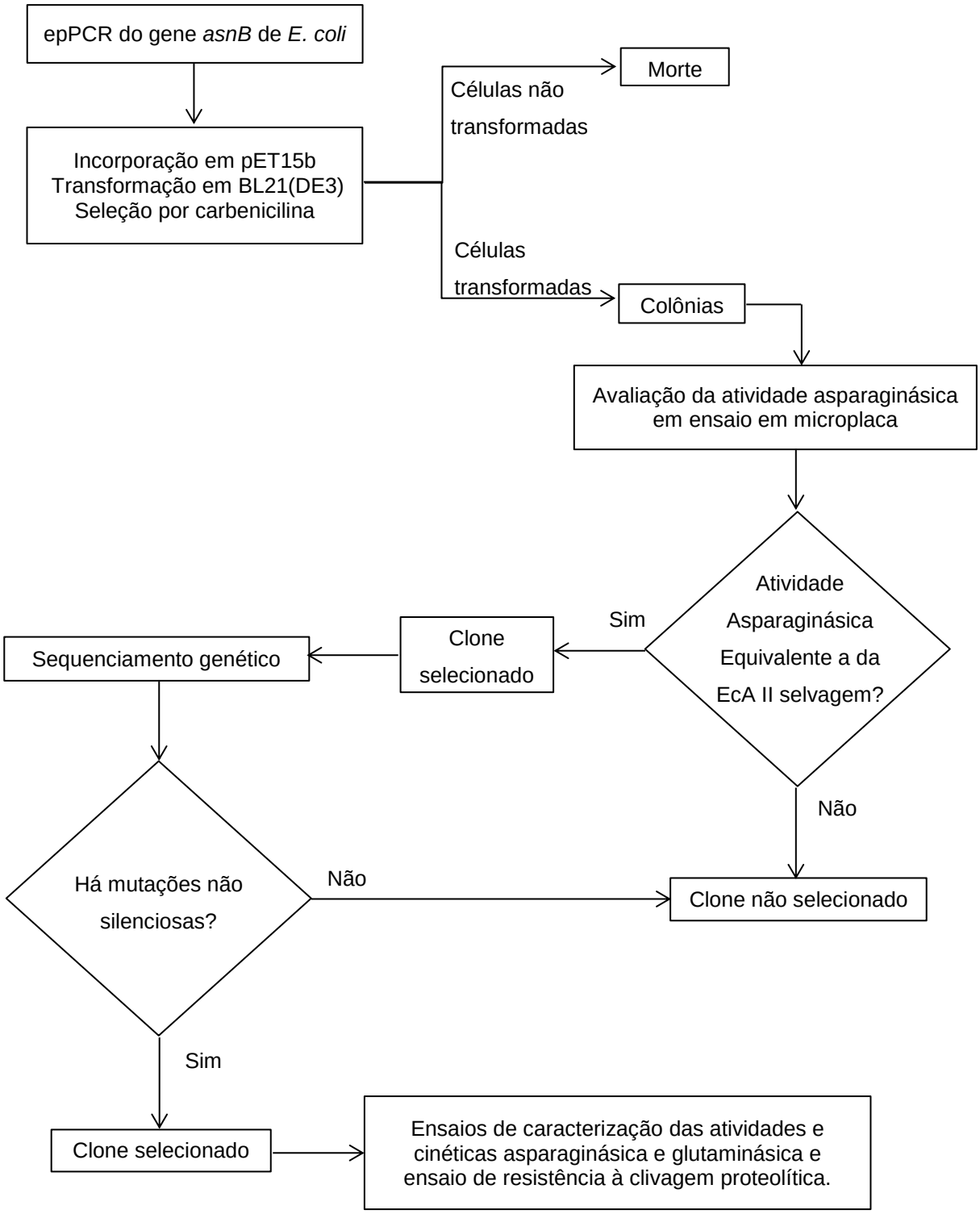
WILSON, K.; WALKER, J. Chapter Eight: Protein Structure, Purification, Characterization and Function Analysis. In: **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology.** 7th ed. Cambridge: Cambrige University Press, 2012b.

WILSON, K.; WALKER, J. Chapter Eleven: Chromatographic techniques. In: **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7th ed. Cambridge: Cambrige University Press, 2012c.

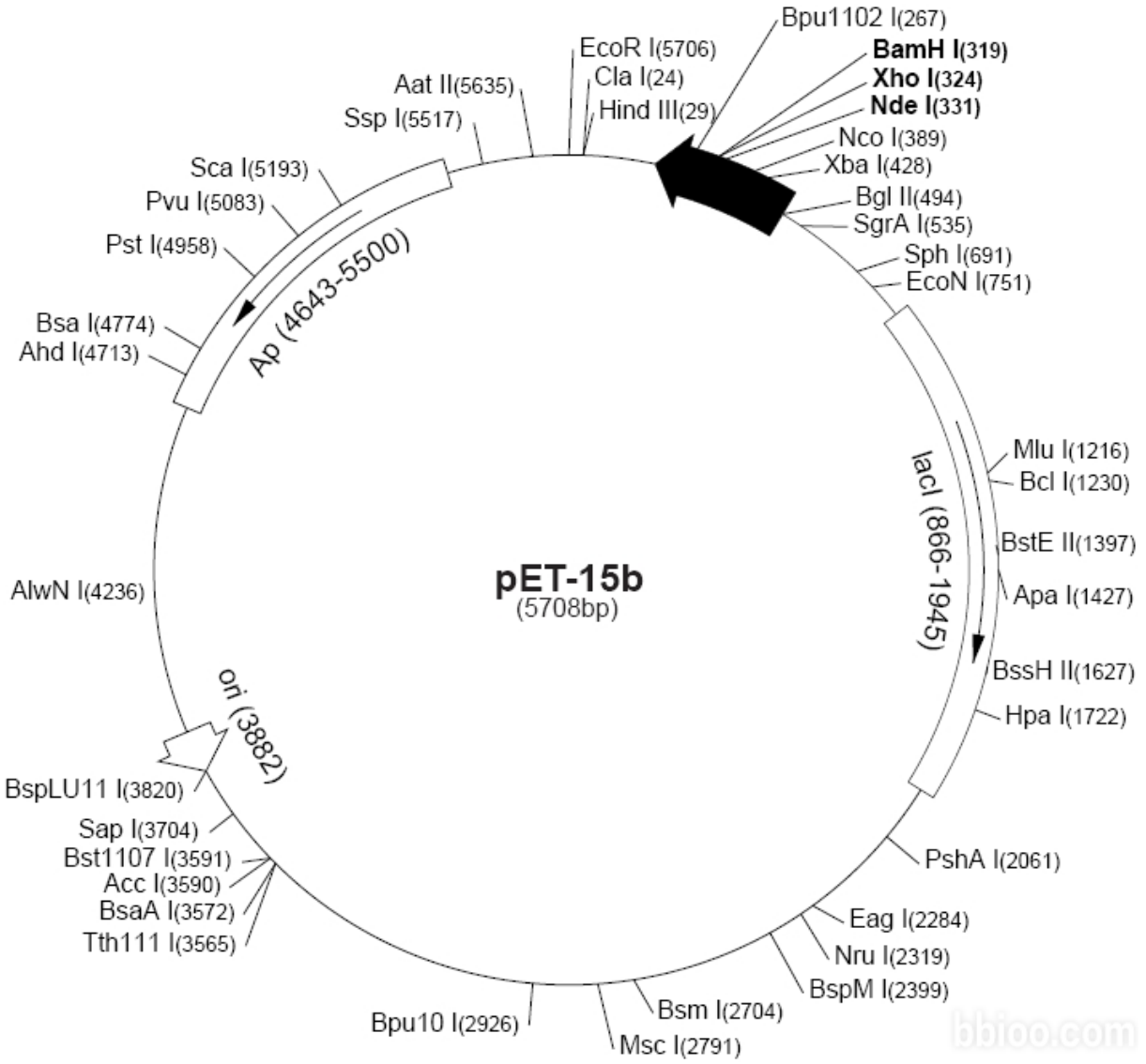
WILSON, K.; WALKER, J. Chapter Fifteen: Enzymes. In: **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology.** 7th ed. Cambridge: Cambrige University Press, 2012d.

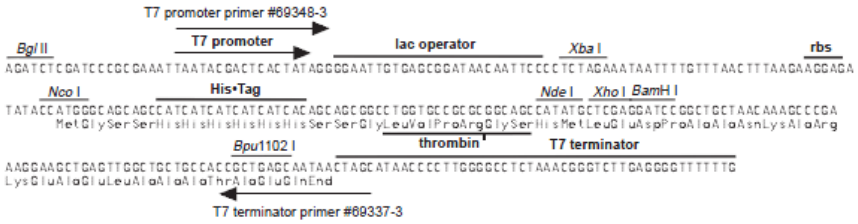
WONG, T. S.; ROCCATANO, D., SCHWANEBERG, U. Steering directed protein evolution: strategies to manage combinatorial complexity of mutant libraries. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 2645–2659. 2007.

ANEXO A – FLUXOGRAMA DO DESENHO EXPERIMENTAL



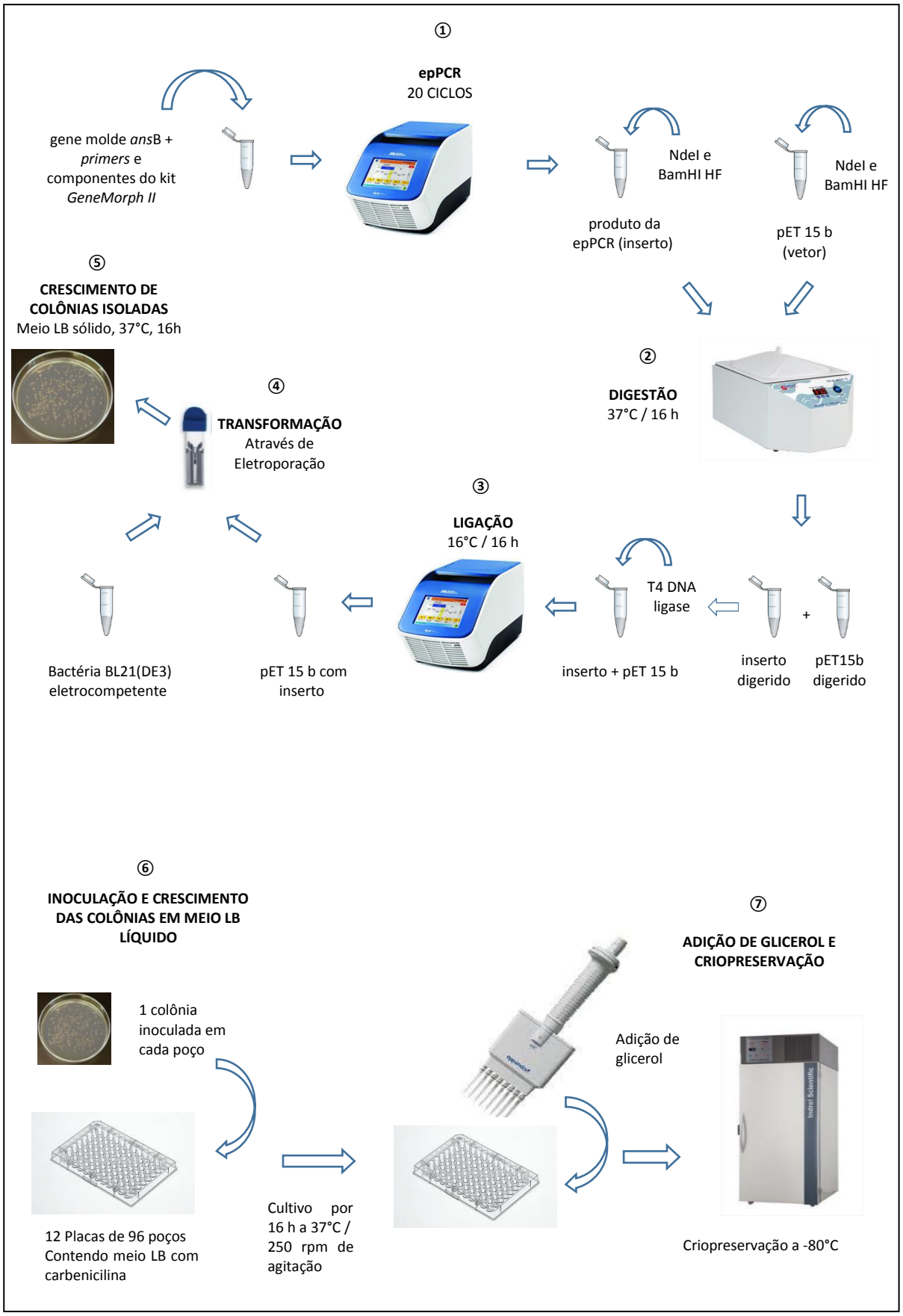
ANEXO B – MAPA DO VETOR PLASMIDIAL pET 15b



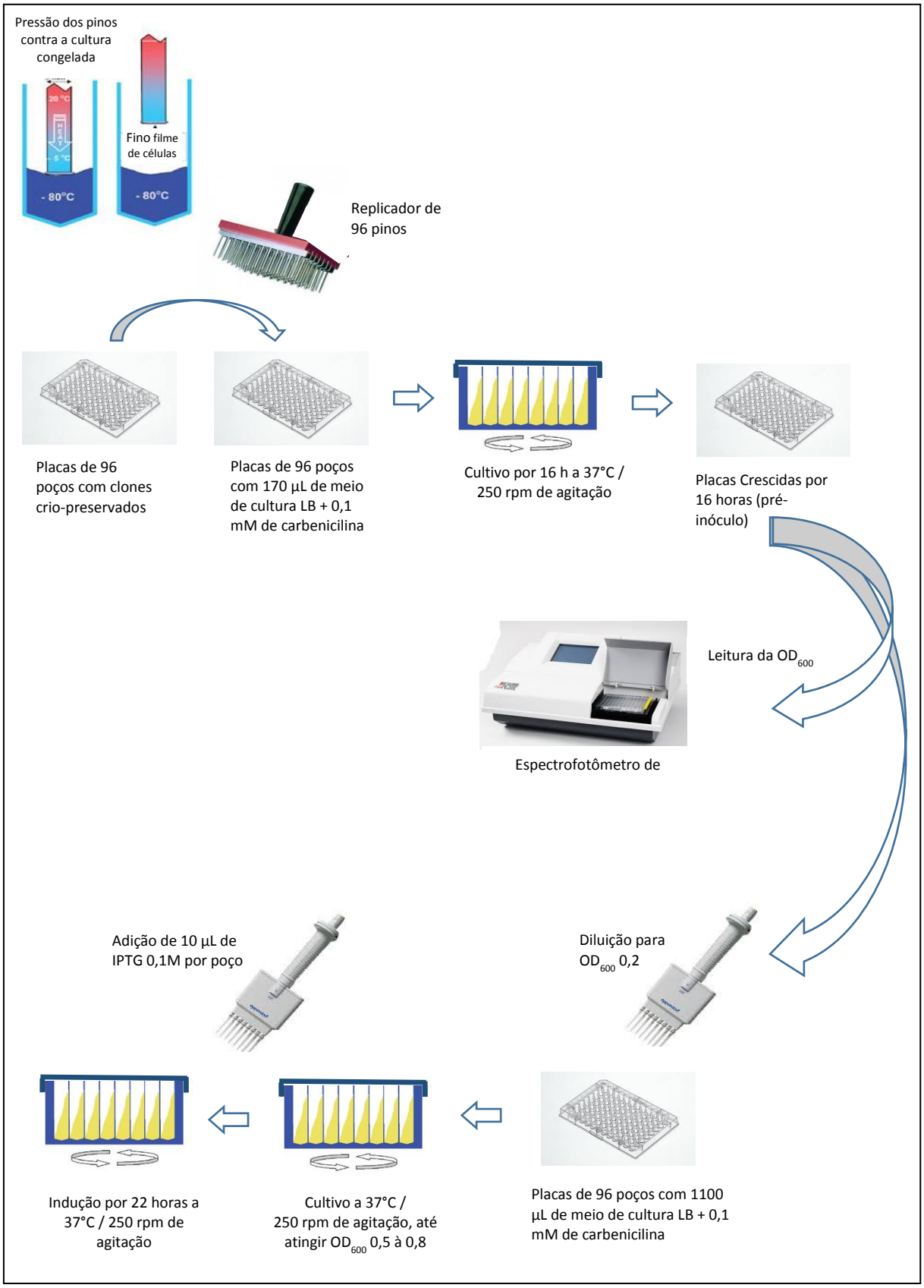


pET-15b cloning/expression region

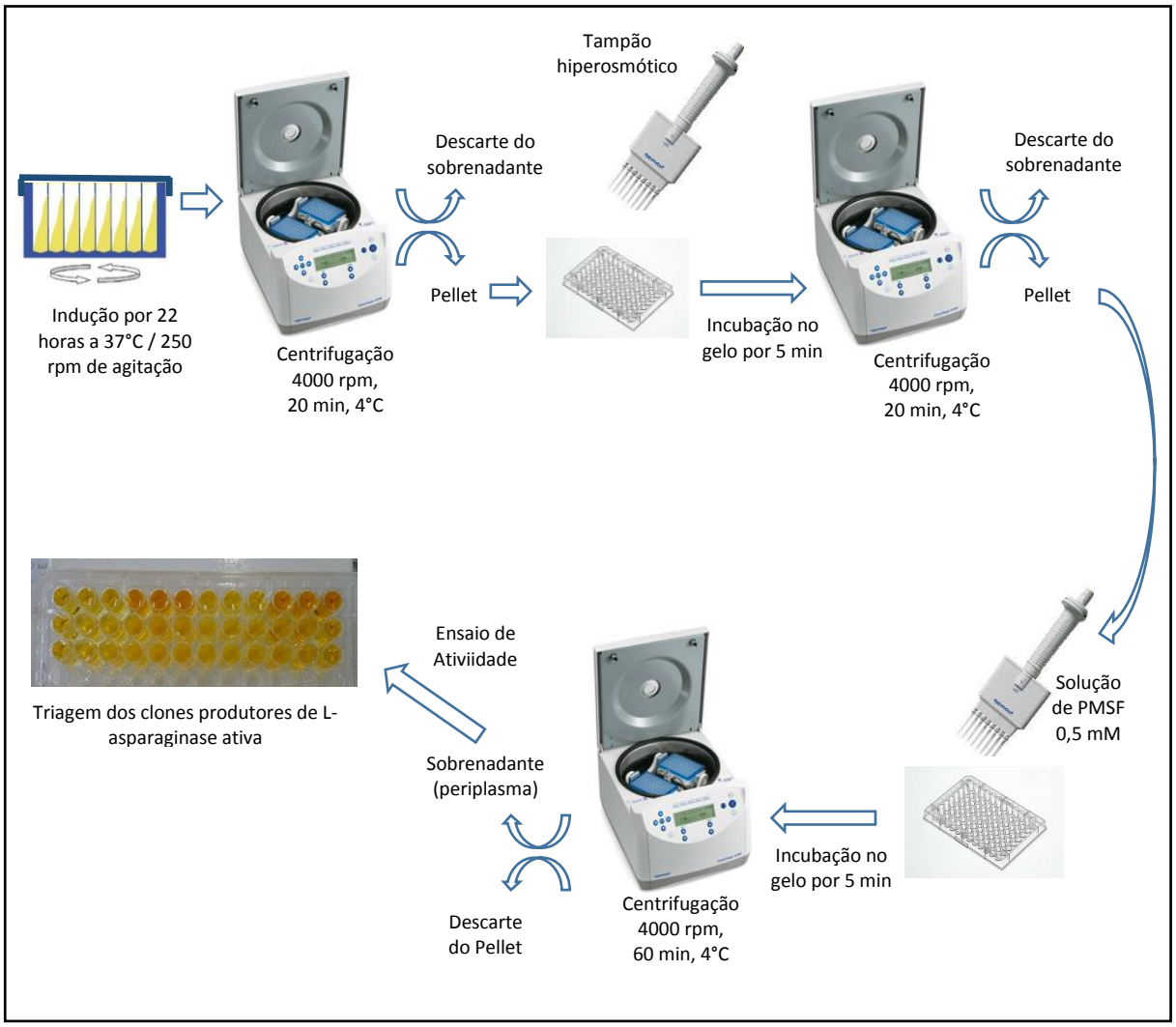
ANEXO **C** – PRODUÇÃO DA BIBLIOTECA DE MUTANTES



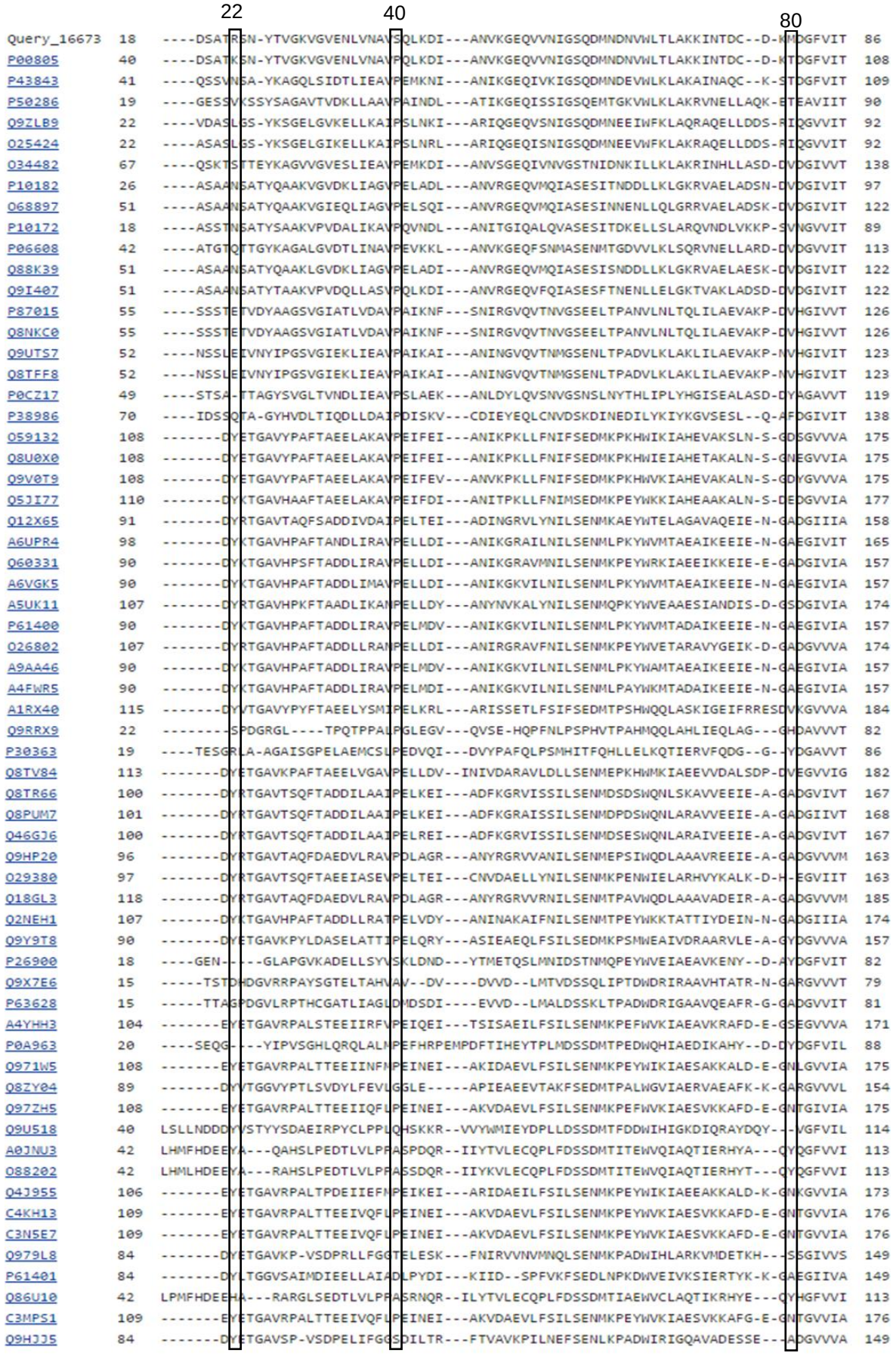
ANEXO D – TRIAGEM DOS MUTANTES PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE ATIVA



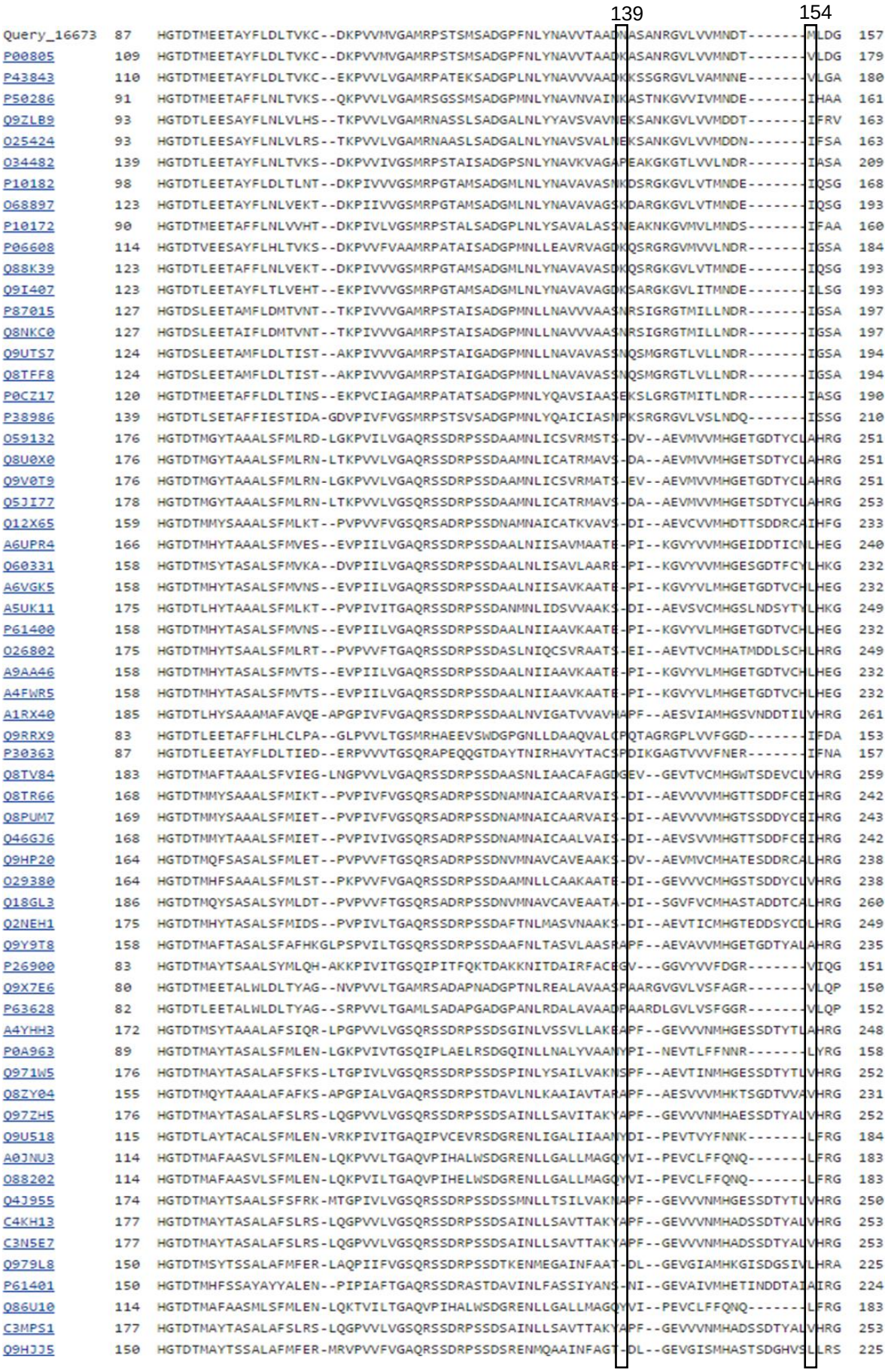
ANEXO D - TRIAGEM DOS MUTANTES PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE ATIVA (continuação)



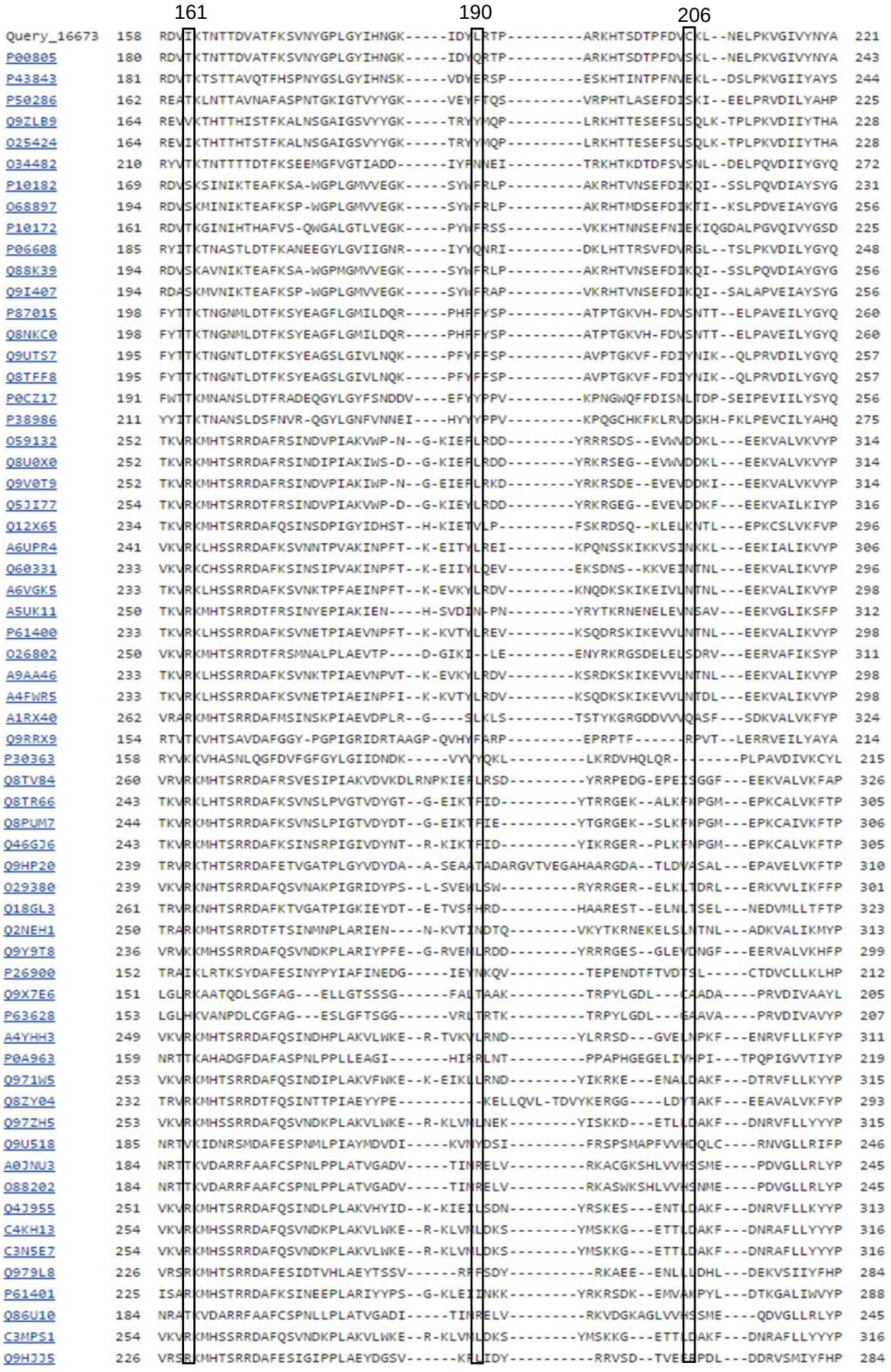
ANEXO E – ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS À ECA II



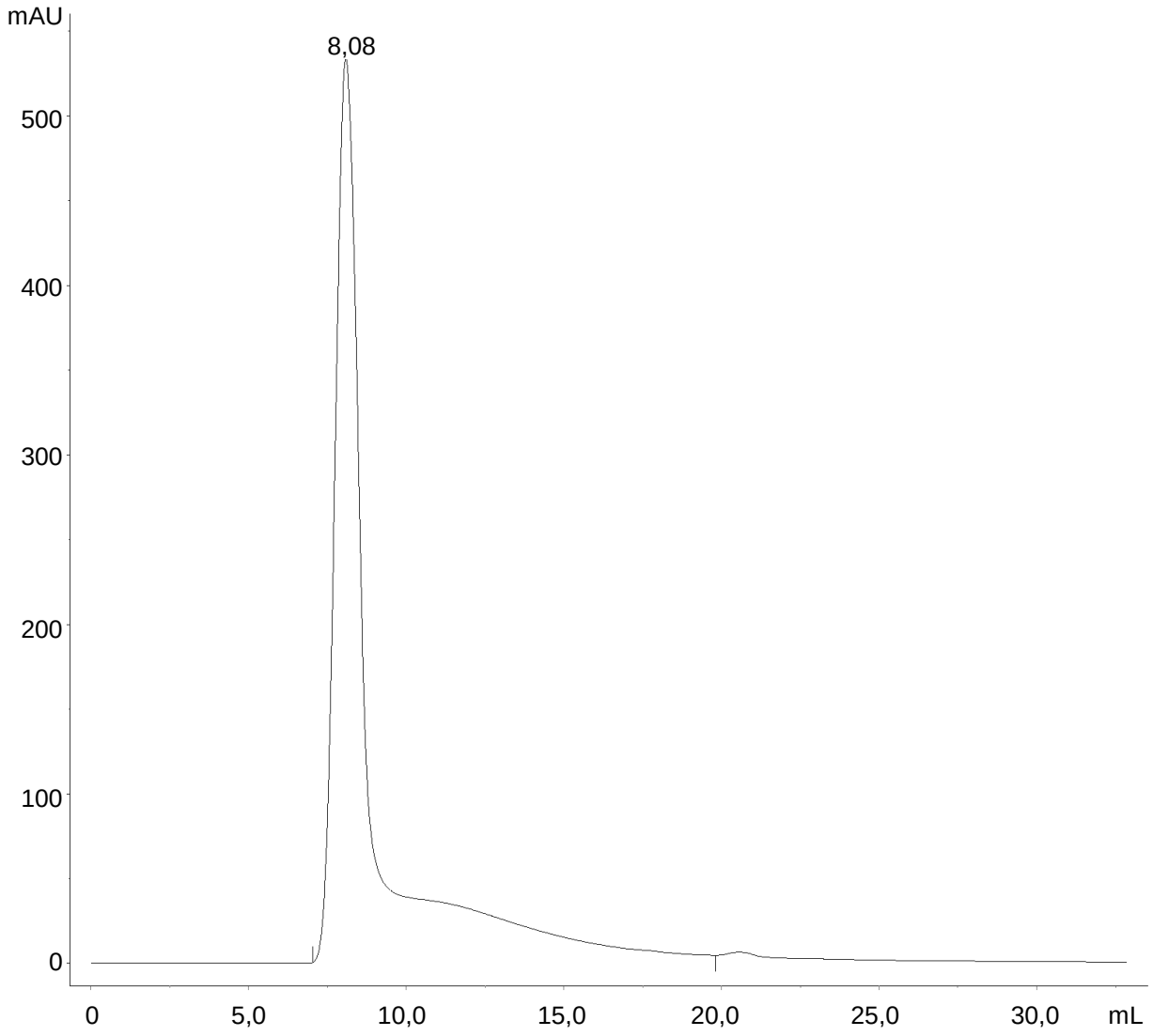
ANEXO E – ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS À ECA II (cont.)



ANEXO E – ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS À ECA II (cont.)

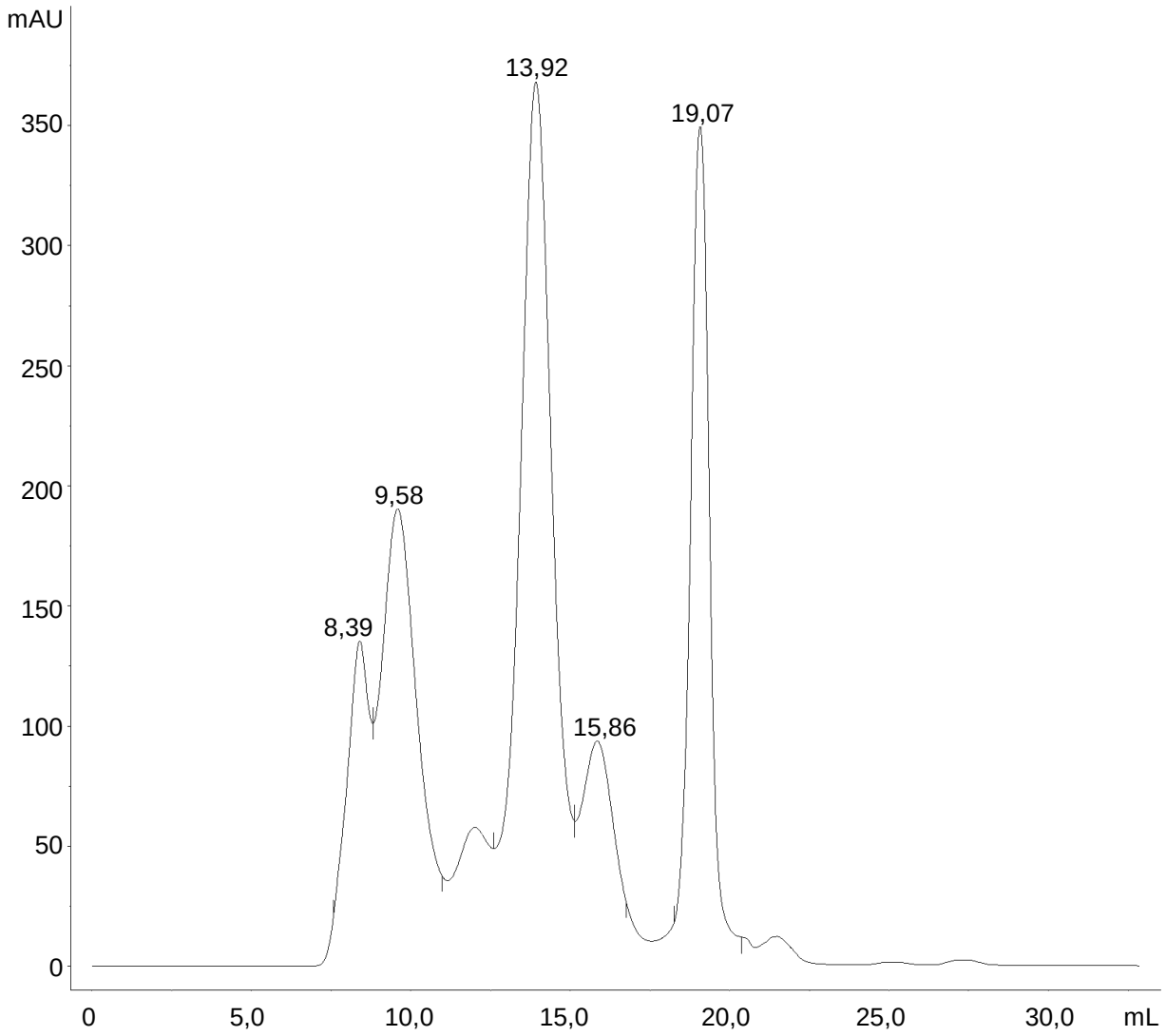


ANEXO F – CROMATOGRAMAS DO PADRÃO *BLUE DEXTRAN 2000*



Anexo F – Cromatograma do padrão de massa molar *Blue Dextran 2000*, realizado em coluna de exclusão molecular Superdex 200 Increase 10/300 GL. Eluição realizada em equipamento FPLC ÄKTA *Purifier*, de maneira isocrática, com tampão Tris-HCl 50 mM e glicina 100 mM, pH 8,6, fluxo de 1 mL/min e monitoramento a 280 nm. Padrão, coluna e equipamento da *GE Healthcare Life Sciences*.

ANEXO G – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE MASSA MOLAR



Anexo G – Cromatograma dos padrões de massa molar ferritina (440 kDa, v_e 9,58 mL), conalbumina (75 kDa, v_e 13,92 mL), anidrase carbônica (29 kDa, v_e 15,86 mL) e ribonuclease A (13,7 kDa, v_e 19,07 mL), realizados em coluna de exclusão molecular Superdex 200 Increase 10/300 GL. Eluição realizada em equipamento FPLC ÄKTA *Purifier*, de maneira isocrática, com tampão Tris-HCl 50 mM e glicina 100 mM, pH 8,6, fluxo de 1 mL/min e monitoramento a 280 nm. Padrões, coluna e equipamento da *GE Healthcare Life Sciences*. OBS: O pico com v_e 8,39 trata-se do dímero da ferritina e não foi utilizado para a construção da curva de calibração da coluna.

ANEXO H – INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS DE MESTRADO/DOUTORADO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

ANEXO I – DISPENSA DA ANÁLISE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

São Paulo, 19 de janeiro de 2016.

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o presente projeto de pesquisa dispensa análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou Comitê de Ética em Experimentação Animal e/ou da Comissão Interna de Biossegurança – CIBio.

Cordialmente

Mariane A.D. Rodrigues

Profa Dra Gisele Monteiro de Souza
Depto de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
FCF/USP

ANEXO J – FICHA DO ALUNO

18/01/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 8868055/1 - Mariane Augusta Domingues Rodrigues

Email:	m.rodrigues@usp.br
Data de Nascimento:	24/06/1985
Cédula de Identidade:	
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmaceutico - Universidade Federal do Paraná - Paraná - Brasil - 2012

Curso:	Mestrado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula:	03/02/2014
Início da Contagem de Prazo:	03/02/2014
Data Limite para o Depósito:	03/08/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Gisele Monteiro de Souza - 03/02/2014 até o presente. Email: smgisele@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 03/02/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 16/04/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 03/02/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2015

Impresso em: 18/01/2016 12:36:26

ANEXO J – FICHA DO ALUNO (cont.)

18/01/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 8868055/1 - Mariane Augusta Domingues Rodrigues

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5733-5/6	Uso Industrial de Enzimas	03/02/2014	06/04/2014	90	6	100	A	N	Concluída
QBQ5802-4/2	Metodologias em Bioquímica e Biologia Molecular: Conceitos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	21/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5731-1/1	Ferramentas de Bioinformática para Análise de Estruturas de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	05/05/2014	15/06/2014	60	4	100	A	N	Concluída
BMM5802-3/2	Biologia Molecular da Expressão do Gene Eucariótico (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	29/07/2014	29/09/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5773-7/4	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	04/08/2014	12/10/2014	30	2	100	A	N	Concluída
QBQ5759-4/4	Tópicos Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular I (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	14/08/2014	26/11/2014	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MPT5760-4/4	Metodologia de Ensino I: Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	15/08/2014	16/10/2014	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
EDM5791-7/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	10/03/2015	20/04/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5700-3/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/05/2015	09/07/2015	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5776-5/2	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	28/09/2015	11/10/2015	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	34
Estágios:			
Total:	0	25	34

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2015
Impresso em: 18/01/2016 12:36:26