

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza - CCMN
Instituto de Química – IQ
Departamento de Bioquímica

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *ASP3* DE *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE EM *ESCHERICHIA COLI***

Wagner Lopes

Rio de Janeiro
Novembro 2018



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza - CCMN
Instituto de Química – IQ
Departamento de Bioquímica

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *ASP3* DE *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE EM *ESCHERICHIA COLI***

Wagner Lopes

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientadores: Rodrigo Volcan Almeida
Elba Pinto da Silva Bon
Maria Antonieta Ferrara

Rio de Janeiro
Novembro 2018

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *ASP3* DE *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE EM *ESCHERICHIA COLI***

Wagner Lopes

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Aprovada por:

Agradecimentos

Agradeço a Deus por permanecer ao meu lado e ter me dado forças, paciência e entendimento para conclusão desse trabalho. Foi Ele quem me fez sonhar e realizar tudo isso.

Meu agradecimento muito especial para Bárbara Adriana F. dos Santos, pela oportunidade de desenvolver esse projeto. Obrigado por tudo!

Aos meus orientadores Dra. Maria Antonieta Ferrara, Dra. Elba Bon e Dr. Rodrigo Volcan Almeida, pela confiança, paciência, atenção e disponibilidade em ajudar.

Ao Dr Fernando Araripe Torres por ser super generoso e atencioso e por ter me recebido em seu laboratório para o início deste projeto.

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica IQ-UFRJ.

Às chefias do Laboratório de Bioprodutos Dra. Graziela Jardim e Fabius Leineweber pelo apoio na continuação deste projeto.

Ao pessoal do LAMMP, IQ/UFRJ, que sempre foi receptivo comigo. Em especial à Juliana Christina que sempre esteve disponível para me ajudar.

Aos doutores Hilton Jorge do Nascimento e Patrícia Barbosa Jurgilas, do Laboratório de Macromoléculas, Bio-Manguinhos/Fiocruz, pela colaboração nos experimentos de exclusão molecular e ponto isoelétrico da proteína.

Ao Dr André Sampaio e a mestrande Ana Paula Fontão do Laboratório de Farmacologia Molecular, Farmanguinhos/Fiocruz pela colaboração nos experimentos de atividade *in vitro* da asparaginase recombinante.

Aos meus familiares, principalmente meus irmãos, e minha mãe que sempre foi uma guerreira e vencedora em tudo que fez.

Aos Doutores Poliana Deolindo e Otávio Padula, pelas correções deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório de Bioprodutos/Farmanguinhos: Angela Almeida, Maria Augusta, Melissa Gomes, Gisele Caputo e Valdenir Ferreira. Em especial ao Alexandre Costa, pelo auxílio e orientação no processo de purificação de proteínas.

À Vanessa França que sempre foi uma amiga e me ajudou em vários momentos da minha vida.

A Farmanguinhos/Fiocruz pelo apoio financeiro e estrutura laboratorial para a execução dos experimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ASP3	Gene que codifica a asparaginase II de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CI	Corpúsculo de inclusão
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
FDA	Food and Drug Administration
LAMMP	Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas
LB	Luria-Bertani
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MTT	{Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PEG	Polietilenoglicol
pI	Ponto isoelétrico
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
TB	Terrific Broth
YNB	Yeast nitrogen base
UI	Unidade Internacional
VE	Volume eluído

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Reação de hidrólise da L-asparagina pela L-asparaginase. B) Esquema da ação da L-asparaginase na corrente sanguínea contra as células tumorais.....	3
Figura 2. Aspectos estruturais da asparaginase bacteriana.....	10
Figura 3. Alinhamento da sequência de aminoácidos de diferentes asparaginases bacterianas.....	12
Figura 4. Mapa do vetor de expressão pET28a (+) mostrando as regiões de clonagem e expressão.....	25
Figura 5. Mapa do vetor de expressão pET22b (+) (<i>Novagen</i>) mostrando as regiões de clonagem e expressão.....	26
Figura 6. Fluxograma da expressão, purificação e parcial caracterização da asparaginase II utilizando a construção pET28a-ASPII.....	42
Figura 7. Fluxograma da expressão, confirmação da proteína e purificação da asparaginase II utilizando a construção pET22b-ASPII.....	43
Figura 8. Amplificação do gene <i>ASP3</i> de <i>S. cerevisiae</i> pela técnica da PCR.....	44
Figura 9. Seleção de clones (<i>E. coli</i> - DH5 α) transformados com pET28a-ASPII. Análise por restrição (<i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>).....	45
Figura 10. Seleção de clones (<i>E. coli</i> - BL21 DE3) transformados com pET28a-ASPII através da indução com IPTG 1 mM para expressão da asparaginase a 37° C.....	46
Figura 11. Seleção de clones (<i>E. coli</i> - DH5 α) transformados com pET22b-ASPII a partir da PCR.....	47
Figura 12. Seleção de clones (<i>E. coli</i> - DH5 α) transformados com pET22b-ASPII. Análise por restrição (<i>NcoI</i> e <i>XhoI</i>).....	48
Figura 13. Amplificação do gene <i>ASP3</i> nos clones (<i>E. coli</i> BL21 DE3) transformados com pET22b-ASPII por PCR.....	48
Figura 14. Seleção de clones (<i>E. coli</i> BL21-DE3) transformados com pET22b-ASPII através da indução com IPTG 1 mM a 37° C.....	49
Figura 15. Expressão solúvel e formação de corpúsculo de inclusão utilizando o plasmídeo pET28a-ASPII em <i>E. coli</i> BL21-DE3.....	50
Figura 16. Expressão solúvel utilizando o plasmídeo pET22b-ASPII em <i>E. coli</i> BL21-DE3.....	52

Figura 17. Atividade específica da asparaginase II a partir do extrato total e da fração solúvel após a lise celular em prensa francesa (<i>French Press</i>) e também da expressão extracelular.....	54
Figura 18. Bandas excisadas do gel para tripsinização e identificação por espectrometria de massas da asparaginase II de <i>S. cerevisiae</i> a partir da expressão em <i>E. coli</i> pET28a-ASP II.....	55
Figura 19. Purificação por Afinidade e troca iônica da asparaginase extracelular expressa utilizando <i>E. coli</i> pET22b-ASP II com o equipamento AKTA Avant 25 (GE).....	57
Figura 20. Purificação em condições desnaturantes (uréia 4 M) da asparaginase extracelular expressa utilizando <i>E. coli</i> BL21 DE – pET22b-ASP II.....	58
Figura 21. Purificação por troca iônica (Capto DEAE) da asparaginase reenovelada expressa em BL21 DE3 utilizando o plasmídeo pET28a-ASP II.....	60
Figura 22. Cromatograma da purificação por troca iônica com gradiente de NaCl da asparaginase solúvel expressa por BL21 DE3 pET28a-ASP II utilizando a coluna Capto Q (GE) – Equipamento: AKTA Avant/GE.....	61
Figura 23. Purificação por troca iônica (Capto Q) da asparaginase solúvel expressa em BL21 DE3 utilizando o plasmídeo pET28a-ASP II.....	61
Figura 24. Atividade em UI/mL das frações purificadas por troca iônica (Capto Q) da asparaginase solúvel expressa em BL21 DE3 utilizando o plasmídeo pET28a-ASP II.....	62
Figura 25. Purificação por afinidade (Histrap) em pH 6,0 da asparaginase II solúvel (<i>E. coli</i> BL21 DE3 pET28a-ASP II).....	63
Figura 26. Purificação por afinidade (Histrap) em pH 7,0 da asparaginase II solúvel (<i>E. coli</i> BL21 DE3 pET28a-ASP II).....	63
Figura 27. Cromatograma (com tempo de retenção) da purificação por IMAC da asparaginase solúvel expressa por <i>E. coli</i> BL21 DE3 pET28a-ASP II.....	65
Figura 28. Purificação por afinidade (Histrap) em pH 8,5 da asparaginase II solúvel (<i>E. coli</i> BL21 DE3 pET28a-ASP II).....	65
Figura 29. Atividade em UI/mL das frações eluídas por IMAC em pH 8,5.....	66
Figura 30. Atividade em UI/mg das frações eluídas por IMAC em pH 8,5 da construção <i>E. coli</i> BL21 DE3 pET28a-ASP II.....	67
Figura 31. Purificação parcial por afinidade (com 4 colunas Histrap interligadas) em pH 8,5 da asparaginase II solúvel (<i>E. coli</i> BL21 DE3 pET28a-ASP II).....	68

Figura 32. Atividade em UI/mL das frações eluídas por IMAC em pH 8,5 utilizando 4 colunas Histrap HP com 200 mL de extrato livre de células (após lise celular).....	68
Figura 33. Perfil cromatográfico da asparaginase II recombinante em coluna Superdex 200 (10/30).....	71
Figura 34. SDS-PAGE 12%. Determinação da Massa Molecular da asparaginase expressa em <i>E. coli</i> sem ou com a presença de DTT.....	71
Figura 35. Focalização isoelétrica da asparaginase II em gel de poliacrilamida.....	73
Figura 36. Determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise da asparagina utilizando a asparaginase II de <i>S. cerevisiae</i> expressa em <i>E. coli</i>	74
Figura 37. Atividade antileucêmica, medida utilizando o MTT, da asparaginase II recombinante expressa em <i>E. coli</i> contra célula do tipo K562.....	75
Figura 38. Atividade antileucêmica, medida utilizando o MTT, da asparaginase II recombinante expressa em <i>E. coli</i> contra célula do tipo Jurkat.....	76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos peptídeos obtidos pela expressão realizada por <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28a-ASPII. Resultados gerados pela base de dados Mascot, correspondendo aos resultados de MS/MS.	55
Tabela 2. Identificação dos peptídeos das bandas do gel da expressão realizada em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pE22b-ASPII. Resultados gerados pela base de dados Mascot, correspondendo aos resultados de MS/MS.....	56
Tabela 3. Etapas de purificação por IMAC da fração solúvel da asparaginase recombinante de <i>S. cerevisiae</i> expressa em <i>E. coli</i> pET28a-ASPII.	66
Tabela 4. Etapas de purificação da asparaginase recombinante de <i>S. cerevisiae</i> por IMAC com quatro colunas interligadas.....	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda	1
1.2. Função da asparaginase no tratamento da LLA	1
1.3. Asparaginase no Brasil.....	8
1.4. Asparaginases.....	9
1.4.1. Asparaginases de <i>E. coli</i> e de <i>E. chrysanthemi</i>	9
1.4.2. Asparaginases de outras fontes	11
1.4.3. Asparaginases de <i>S. cerevisiae</i>	15
1.5. Produção de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	16
1.6. O projeto Asparaginase	18
 2. JUSTIFICATIVAS.....	 19
 3. OBJETIVOS.....	 22
3. 1. Objetivo geral.....	22
3. 2. Objetivos específicos.....	22
 4. MATERIAIS E MÉTODOS	 23
4.1. Microrganismos utilizados	23
4.2. Meios e soluções	23
4.3. Plasmídeos pET28a(+) e pET22b(+)......	24
4.4. Extração genômica de <i>S. cerevisiae</i>	27
4.5. Iniciadores de DNA utilizados nas clonagens	27
4.6. Amplificação do gene <i>ASP3</i> de <i>S. cerevisiae</i>	28
4.7. Digestão do DNA com enzimas de restrição.....	28
4.8. Separação e recuperação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose.....	28

4.9. Ligação do fragmento de DNA no vetor pET28a	29
4.10. Subclonagem do gene <i>ASP3</i> em pET22B	29
4.11. Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	29
4.12. Transformação de <i>E. coli</i> (DH5 α e DE3) com os plasmídeos pET28A-ASPII e pET22B-ASPII e extração plasmidial.....	30
4.13. Análise de colônias/clones transformantes pela reação em cadeia da polimerase – PCR..	31
4.14. Sequenciamento de DNA	31
4.15. Expressão da asparaginase II em <i>E. coli</i> BL21 (DE3), utilizando as construções pET28a-ASPII e pET22b-ASPII.....	31
4.15.1. Expressão em pequena escala (3 mL)	31
4.15.2. Expressão em frascos agitados (1 L).....	32
4.16. Lise celular e obtenção dos corpúsculos de inclusão da cultura utilizando a construção pET28a-ASPII.....	33
4.17. Reenovelamento (<i>refolding</i>) da asparaginase II expressa por <i>E. coli</i> pET28a-ASPII.....	33
4.18. Purificação por afinidade a íons imobilizados (IMAC)	34
4.19. Purificação da proteína após o reenovelamento	35
4.20. Purificação da asparaginase solúvel expressa por <i>E. coli</i> pET28a-ASPII.....	35
4.21. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio – SDS-PAGE ..	35
4.22. Quantificação de proteína por Bradford.....	36
4.23. Análise da atividade asparaginásica	36
4.24. Quantificação da massa celular	37
4.25. Digestão trípica em gel de poliacrilamida.....	38
4.26. Análise de peptídeos por Espectrometria de Massas.....	39
4.27. Determinação de massa molar por cromatografia de exclusão molecular	40
4.28. Focalização Isoelétrica	40
4.29. Avaliação da atividade glutaminásica	41
4.30. Ensaios de atividade antitumoral in vitro por MTT	41
4.31. Fluxograma da expressão, purificação e parcial caracterização da asparaginase II utilizando a construção pET28a-ASPII e pET22b-ASPII	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

5.1. Amplificação e clonagem do gene <i>ASP3</i>	44
5.2. Subclonagem do gene <i>ASP3</i> para expressão extracelular da asparaginase II utilizando o vetor pET22b.....	46
5.3. Expressão da asparaginase II em frascos agitados utilizando os clones <i>E. coli</i> pET28a-ASPII e <i>E. coli</i> pET22b-ASPII e análise por Espectrometria de Massas para identificação da asparaginase de <i>S. cerevisiae</i>	49
5.4. Identificação asparaginase recombinante por espectrometria de massas	54
5.6. Reenovelamento e purificação da asparaginase do corpúsculo de inclusão (CI) da expressão utilizando <i>E. coli</i> pET28A-ASPII	59
5.7. Purificação por troca iônica da asparaginase da fração solúvel expressa por <i>E. coli</i> pET28a-ASPII.....	60
5.8. Purificação por IMAC da asparaginase da fração solúvel expressa por <i>E. coli</i> pET28a-ASPII.....	62
5.9. Caracterização da asparaginase recombinante (fração solúvel) expressa por <i>E. coli</i> pET28a-ASPII purificada por IMAC.....	69
5.9.1. Determinação da Massa Molar.....	69
5.9.2. Focalização Isoelétrica	72
5.9.3. Avaliação da atividade glutaminásica	73
5.10. Atividade antitumoral <i>in vitro</i> da asparaginase recombinante	75
 6. CONCLUSÕES	 78
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	79
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	80

RESUMO

Clonagem e expressão do gene *ASP3* de *Saccharomyces cerevisiae* em *Escherichia coli*

Wagner Lopes

Orientadores: Rodrigo Volcan Almeida

Elba Pinto da Silva Bon

Maria Antonieta Ferrara

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia maligna do sistema hematopoiético caracterizada pela alteração do crescimento e proliferação das células linfoblásticas na medula óssea com consequente acúmulo de células jovens indiferenciadas. A enzima L-asparaginase é usada como agente antineoplásico na quimioterapia da LLA e possui grande interesse para a medicina e para a comunidade científica. As enzimas utilizadas no tratamento da LLA são obtidas através das bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. No entanto, ambas as formas nativas causam hipersensibilidade clínica e reações alérgicas agudas. Este medicamento é considerado estratégico para o Sistema Único de Saúde (SUS), sem produção de biossimilares no País e para aplicações clínicas depende de importação. Por esses motivos, a busca de novas fontes de asparaginase e a construção de genes para o aumento da expressão de forma recombinante são notavelmente atrativas. Neste trabalho, o gene *ASP3* que codifica a asparaginase II em de *S. cerevisiae* foi clonado em *E. coli* utilizando os vetores pET28a (expressão intracelular) e pET22b (expressão extracelular). A confirmação do gene foi realizada por sequenciamento de DNA e a proteína recombinante foi confirmada por espectrometria de massas. A expressão da asparaginase, em frascos agitados, para a construção com pET28a-ASPII foi maior, quando se considera a atividade total obtida (atividade extracelular somada à atividade no pellet), apresentando 240,15 UI/g de célula, enquanto que para pET22b-ASPII, foi obtido o valor total de 209,5 UI/g de célula. Em experimentos preliminares de

purificação, a enzima extracelular obtida com a construção pET22b-ASPII não apresentou atividade enzimática. No entanto, a asparaginase II intracelular solúvel obtida através da construção pET28a-ASPII foi purificada por afinidade e apresentou a atividade específica de 7,85 UI/mg de proteína. O fato de a proteína ter sido purificada com atividade enzimática sugere que a glicosilação não desempenha papel essencial na atividade da asparaginase II de *S. cerevisiae*. A massa molar da subunidade da enzima em gel desnaturante foi de aproximadamente 38 kDa, enquanto a forma nativa, estimada por cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200, foi de 178 kDa, sugerindo uma estrutura tetramérica para a proteína, como ocorre para as enzimas de *E. coli* e *E. chrisanthemi*. Esse valor difere do obtido para a asparaginase II recombinante expressa em *P. pastoris*, que foi de 136 kDa. O ponto isoelétrico (pI) estimado foi de 4,3, próximo ao pI da proteína expressa em *P. pastoris* e da proteína nativa de *E. coli*, 4,5. A enzima recombinante apresentou baixa atividade glutaminásica, o que possibilita a sua utilização como medicamento por apresentar menor risco de efeitos tóxicos durante a terapia contra o câncer. Também apresentou atividade antitumoral dose-dependente em testes com as linhagens celulares leucêmicas K562 e Jurkat, com IC₅₀ de 3,63 e 1,77 UI/mL, respectivamente. O conjunto dos resultados indica a asparaginase II de *S. cerevisiae* recombinante expressa em *E. coli* como um potencial medicamento a ser desenvolvido para o tratamento da LLA.

Palavras-chave: Leucemia linfoblástica aguda (LLA), asparaginase II, *Saccharomyces cerevisiae*, gene ASP3, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Cloning and expression of *Saccharomyces cerevisiae* *ASP3* gene in *Escherichia coli*

Wagner Lopes

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant neoplasia of the hematopoietic system characterized by altered growth and proliferation of lymphoblastic cells in the bone marrow, with consequent accumulation of undifferentiated young cells. The enzyme L-asparaginase is used as an antineoplastic agent in the chemotherapy of ALL and is of great interest to medicine and the scientific community. The enzymes used in the treatment of ALL are obtained by *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*. However, both native forms cause clinical hypersensitivity and acute allergic reactions. This enzyme is a product considered strategic in prospective studies in the area of Public Health in Brazil, without production of biosimilars in the country and for clinical applications depends on importation. For these reasons, the search for new sources of asparaginase and the construction of genes to increase expression in a recombinant way are remarkably attractive. In this work, the *ASP3* gene that natively expresses asparaginase II in small concentrations by *S. cerevisiae* was cloned in *E. coli* using the vectors pET28a (intracellular expression) and pET22b (extracellular expression). Gene confirmation was performed by DNA sequencing and the recombinant protein sequence was confirmed by Mass Spectrometry. The expression of asparaginase in stirred flasks for the construction with pET28a-ASP^{II} was higher when considering the total activity obtained by ammonium dosing (extracellular activity added to pellet activity). For the pET28a-ASP^{II} construct, this value was 240.15 IU/g cell, while for pET22b-ASP^{II}, the total value was 209.5 IU/g cell. In preliminary purification experiments, the

extracellular enzyme obtained with the pET22b-ASP II construct showed no enzymatic activity. However, the soluble intracellular asparaginase II obtained through the pET28a-ASP II construct was affinity purified and presented a specific activity of 7.85 IU mg⁻¹ of protein. The fact that the protein has been purified with enzymatic activity indicates that glycosylation does not appear to play an essential role in asparaginase II activity, which makes *E. coli* to be used as a recombinant asparaginase II expression system. The molar mass of the subunit in denaturing gel enzyme was approximately 38 kDa, while the native form, estimated by exclusion chromatography on Superdex 200, was 178 kDa, suggesting a tetrameric structure, such as those of *E. coli* and *E. chrysanthemi*. This molecular mass differs from the recombinant asparaginase II expressed in *P. pastoris* which was 136 kDa. The estimated isoelectric point (pI) was 4.3, approximate to the pI of the asparaginase II expressed in *P. pastoris* and native *E. coli* protein, 4.5. The recombinant enzyme showed low glutaminase activity, which makes it possible to use it as a drug because it presents a lower risk of toxic effects during cancer therapy. It also showed antitumor activity against the K562 and Jurkat cell lines in a dose-dependent manner with IC₅₀ of 3.63 and 1.77 IU/mL, respectively. Therefore, due to these results the recombinant asparaginase II expressed in *E. coli* has promising characteristics for use as a medicament for the treatment of ALL.

Key words: Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), asparaginase II, *Saccharomyces cerevisiae*, ASP3 gene, *Escherichia coli*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é uma neoplasia maligna, caracterizada pelo acúmulo de células linfoblásticas imaturas na medula óssea, sendo os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes resultantes de graus variáveis de anemia, neutropenia, trombocitopenia e infiltração dos tecidos por células leucêmicas (Kebriaei *et al.*, 2003). A LLA é o tipo de câncer mais comum na infância (INCA, 2014). Globalmente, 3 em 100 mil indivíduos podem adquirir ou desenvolver a doença, principalmente em idades menores que seis anos (Grigoropoulos *et al.*, 2013).

Embora a causa da LLA seja desconhecida, é improvável que a transformação leucêmica seja resultante de um evento único, mas do acúmulo de múltiplos processos envolvendo interações complexas entre a susceptibilidade do indivíduo, danos cromossômicos causados pela exposição a agentes químicos ou físicos e provavelmente à incorporação de informações genéticas virais transmitidas às células progenitoras susceptíveis (Kebriaei *et al.* 2003).

A chance de cura na LLA tem aumentado e aproxima-se de 80%, sendo este avanço decorrente da melhora no diagnóstico, identificação de fatores prognósticos e utilização de tratamentos adaptados ao grupo de risco de cada paciente (Vila *et al.*, 2003). Em países desenvolvidos, 70 a 80% das crianças recém-diagnosticadas apresentam uma sobrevida livre de doença prolongada, sendo que a maioria desses pacientes alcança a cura (Pui *et al.*, 2001).

1.2. Função da asparaginase no tratamento da LLA

A descoberta e desenvolvimento da enzima asparaginase como agente antineoplásico teve início em 1953, quando Kidd observou a inibição do crescimento de tumores induzidos em ratos e camundongos depois do tratamento com soro de porquinhos da Índia (Kidd, 1953). Posteriormente, Broome (1961) relacionou definitivamente a propriedade antitumoral do soro do porquinho da Índia à atividade da L-asparaginase e, em seguida, uma asparaginase foi isolada de *E. coli* B, a qual era mais eficiente em induzir a morte de células leucêmicas (Mashburn & Wriston, 1963, 1964). Após extensos estudos clínicos, a asparaginase foi adotada em diversos protocolos

quimioterápicos para o tratamento de doenças hematopoiéticas malignas, leucemia linfoblástica aguda e linfomas não Hodgkin, tendo sido introduzida no mercado em 1978. As formulações são utilizadas por via intravenosa ou intramuscular, geralmente associadas a agentes alquilantes e outros antagonistas metabólicos (Müller & Boos, 1998).

O substrato da enzima L-asparaginase é a L-asparagina, um aminoácido que possui papel importante na biossíntese de proteínas, DNA e RNA (Rytting, 2012). Particularmente, é nutriente crítico para as células cancerosas, em decorrência do aumento da taxa de proliferação e do processo metabólico nessas células (Luhana *et al.*, 2013). A L-asparaginase catalisa a hidrólise de asparagina em ácido aspártico e amônia, levando à depleção de asparagina disponível para certas células tumorais, que são incapazes de produzir esse aminoácido (Figura 1A). A ação da L-asparaginase não afeta o funcionamento das células saudáveis, pois estas podem produzir seus próprios suprimentos do aminoácido, não necessitando obtê-lo através da dieta (Figura 1B). Diferente das células normais, as células malignas geralmente possuem baixos níveis de asparagina sintetase e não conseguem regular positivamente o gene desta enzima durante as condições de depleção da asparagina, sintetizando este aminoácido lentamente. Dessa forma, a célula tumoral deverá obter o aminoácido através da corrente sanguínea. A administração de asparaginase degrada as reservas de L-asparagina no plasma, impedindo, portanto, que as células tumorais assimilem o aminoácido, provocando a morte destas (Kiriya *et al.*, 1989; Moola *et al.*, 1994; Soares *et al.*, 2002; Narta *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2015).

Além de tratar a LLA, a asparaginase também pode ser usada no tratamento de outras doenças leucêmicas, como doença de Hodgkin, a leucemia mielomonocítica aguda, linfossarcoma, reticulossarcoma e melanossarcoma (Durval *et al.*, 2002).

A L-asparaginase apresenta também importante aplicação na indústria de processamento de alimentos através da sua utilização na prevenção da formação de acrilamida, que é liberada durante a fritura de alimentos. A acrilamida apresenta um risco à saúde devido ao seu potencial carcinogênico (Hendriksen *et al.*, 2009; Mingmei *et al.*, 2013).

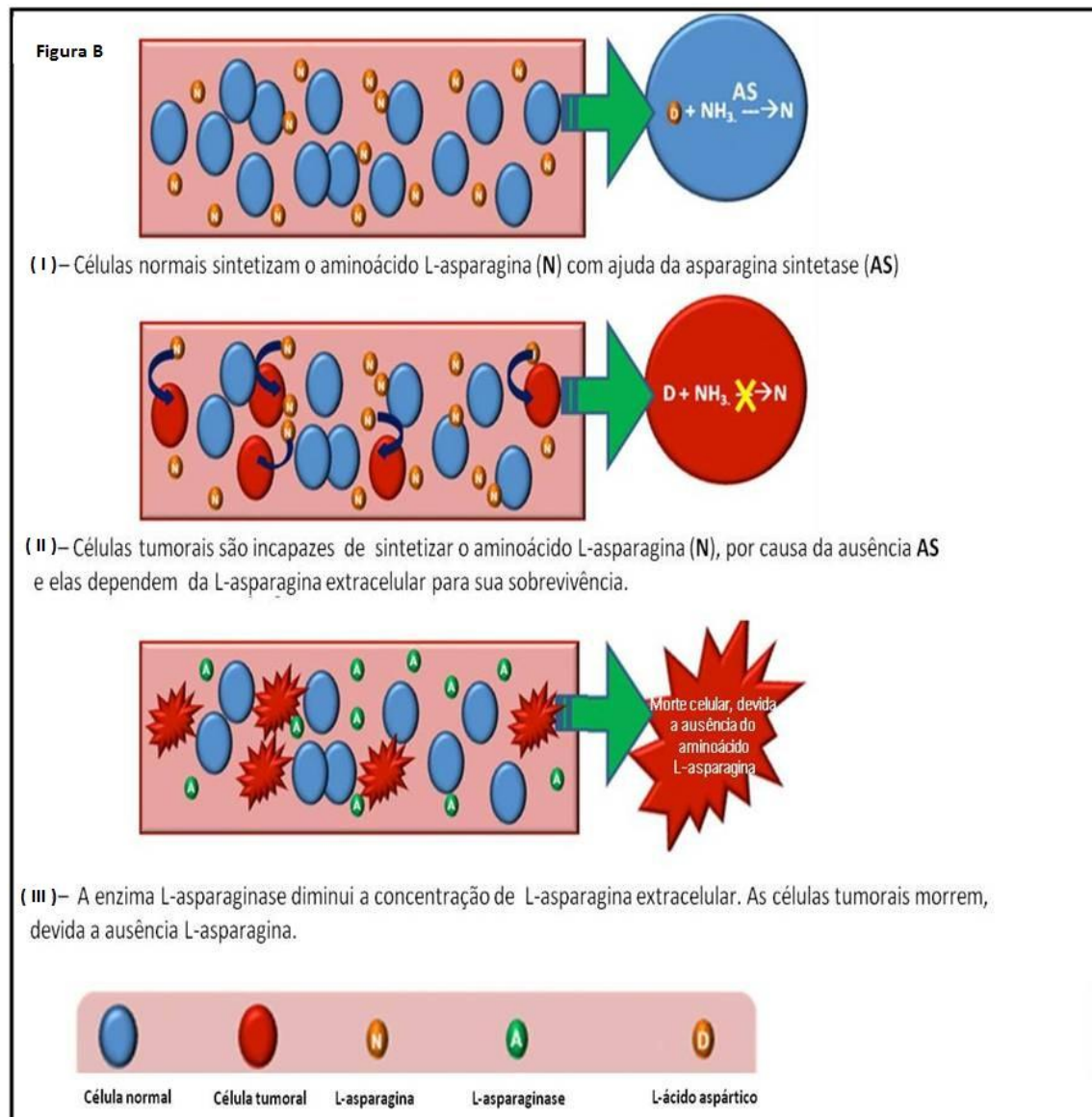
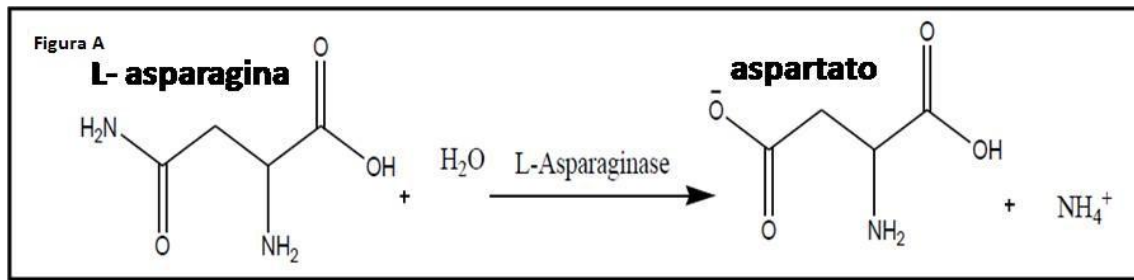


Figura 1 – **A)** Reação de hidrólise da L-asparagina pela L-asparaginase (adaptado de Narta *et al.*, 2007); **B)** Esquema da ação da L-asparaginase na corrente sanguínea contra as células tumorais (adaptado de Shrivastava *et al.*, 2015).

A L-asparaginase é obtida através das bactérias *Escherichia coli* ou *Erwinia chrysanthemi* (Silverman *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001). Atualmente existem três preparações utilizando asparaginase no mercado: a asparaginase nativa de *E. coli*, a asparaginase de *E. coli* modificada com polietilenoglicol (Pegasparagase; Oncaspar®; Enzon, Inc., Bridgewater, NJ, EUA) e a asparaginase nativa de *E. chrysanthemi*; (Erwinase® (Ipsen – Speywood Pharmaceuticals Ltd, UK). As preparações nativas obtidas de *E. coli* são fornecidas sob diferentes marcas como Medac® (Kyowa Hakko, Kogyo, Japão), Crasnitin® (Bayer AG, Leverkusen, Alemanha), Leunase® (Sanofi-Aventis, Paris, França) Paronal®, e Kidrolase® na Europa e na Ásia (Boos *et al.*, 1996; Ahlke *et al.*, 1997).

A asparaginase bacteriana é a única enzima aprovada pela FDA para a terapia humana (Appel *et al.*, 2010). No entanto, uma significativa porcentagem de pacientes tem apresentado reações imunológicas durante o tratamento utilizando a asparaginase nativa de *E. coli* (Dellinger & Miale, 1976; Evans *et al.*, 1982). Adicionalmente, o paciente pode desenvolver resistência ao medicamento. A medicação provoca diversos efeitos colaterais, entre os quais pancreatite, reações anafiláticas e o agravamento de disfunções hepáticas. Além desses problemas, um fator limitante do uso de asparaginase é a sua curta meia-vida no sangue, cerca de 30 horas para a enzima de *E. coli*, tornando necessárias aplicações sucessivas. Assim, a utilização da asparaginase está restrita ao ambiente hospitalar com acompanhamento médico rigoroso.

A enzima oriunda de *Erwinia chrysanthemi*, de custo muito mais alto e de meia-vida mais curta (15,6 horas) (Asselin *et al.*, 1993), é empregada como terapia alternativa à de *E. coli* devido às diferenças nas especificidades imunológicas, para minimizar os efeitos colaterais em pacientes hipersensíveis (Müller e Boos, 1998, Aghaiypour *et al.*, 2001, Vrooman *et al.*, 2010). Para Pasut & Veronese (2009), ambas as formas nativas causam hipersensibilidade clínica e reações alérgicas agudas.

Dentro deste quadro de hipersensibilidade, a L-asparaginase de *E. coli* conjugada ao polietilenoglicol (PEG) é uma opção como medicamento de primeira escolha, já que o PEG é utilizado para proteger os sítios antigênicos na superfície da proteína, além de aumentar a meia-vida plásmica do biofármaco para 5,73 dias (Asselin *et al.*, 1993). Abuchowski e colaboradores (1979) fizeram o acoplamento da enzima ao PEG, que resultou em imunogenicidade reduzida sem alterar a propriedade antineoplásica da enzima. Essa proteína com PEG foi testada em modelo animal e apresentou uma reduzida formação de anticorpos comparada com a forma nativa, e um aumento significativo da meia vida da enzima (Yoshimoto *et al.*, 1986). No entanto,

alguns trabalhos mostraram que a PEG-asparaginase não é muito superior à asparaginase de *E. coli* nativa na indução da primeira remissão da LLA. Além disso, estudos farmacológicos indicaram que a PEG-asparaginase é eficaz em reduzir os níveis de asparagina plasmáticos, mas não é capaz de causar tal redução nos níveis desse aminoácido no fluido cérebro-espinhal (Avramis *et al.*, 2005; Masetti & Pession, 2009). O custo atual da PEG - asparaginase é maior do que o da forma nativa da enzima, mas as visitas menos frequentes aos serviços de saúde e a redução da incidência de complicações imunogênicas tornam o custo global do tratamento próximo ao do que utiliza preparações com a proteína nativa (Narta *et al.*, 2007).

Segundo alguns autores (Kotzia; Labrou, 2005; Prakasham *et al.*, 2007), para utilização da L-asparaginase como um elemento chave no tratamento da LLA, a enzima deve ser desprovida de atividade glutaminase, pois esse aminoácido é a principal forma de transporte de nitrogênio no sangue e também uma doadora de grupamento amina para muitas reações biossintéticas. Um declínio prolongado nos níveis plasmáticos de glutamina prejudica uma variedade de funções bioquímicas, especialmente as do fígado (Derst *et al.*, 2000). A toxicidade das asparaginases bacterianas de *E. coli* e de *E. chrysantemi* é parcialmente atribuída ao fato dessas enzimas apresentarem também atividade glutaminásica, sendo esta menos pronunciada na enzima de *E. coli*. Algumas asparaginases são reportadas com baixa ou livres de atividade glutaminase, tais como a de *Erwinia carotovora* (Wink *et al.*, 2010) e a de *Bacillus subtilis* (Mingmei *et al.*, 2013).

Várias tentativas têm sido feitas para produzir a L-asparaginase livre de atividade glutaminásica e para prolongar a meia-vida da enzima, visando garantir uma implementação bem sucedida ao tratamento da LLA (Ali *et al.*, 2015). Por isso, é necessário identificar os resíduos de aminoácidos na L-asparaginase que desempenham a função de contribuir para a estabilidade da enzima, especificidade e imunogenicidade (Ali *et al.*, 2015). Estudos realizados a partir da comparação da sequência de aminoácidos e da estrutura dos cristais da enzima L-asparaginase de *E. chrysanthemi* com outras sequências de aminoácidos de fontes bacterianas demonstram que a substituição dos aminoácidos glutamina e asparagina no centro ativo com Glu63 e Ser254, respectivamente, pode diminuir a atividade glutaminase da L-asparaginase (Aghaiypour *et al.*, 2001). Por outro lado, Parmentier e colaboradores (2015) forneceram evidências de que a atividade glutaminase da L-asparaginase é essencial para a sua citotoxicidade contra as células leucêmicas. Como a glutamina atua como um doador do grupo amino para a enzima asparagina sintetase para a biossíntese *de novo* da

L-asparagina, então a clivagem da glutamina, pela L-asparaginase também ajudaria a manter a redução do nível de asparagina e assim contribuiria para o efeito terapêutico da L-asparaginase (Zeidan *et al.*, 2009).

As propriedades nativas das enzimas podem ser alteradas para as necessidades industriais de várias maneiras, desde modificações químicas simples, como bio-conjugações, até abordagens avançadas de engenharia baseadas em informações estruturais de proteínas. A estratégia adotada para a modificação varia de proteína para proteína, dependendo da propriedade que é focada. A estabilidade estrutural da proteína pode ser alcançada pela alteração da estrutura primária da proteína através de ferramentas de engenharia de proteínas para identificar os resíduos de aminoácidos favoráveis e desfavoráveis em uma posição particular da proteína e essa substituição pode resultar no aumento nas propriedades funcionais desejadas da proteína (Vidya *et al.*, 2017). Modificações realizadas nas posições 176 (Y176F) e 66 (W66Y) da L-asparaginase de *E. coli* resultaram em variantes com elevada atividade glutaminase e apresentaram maior citotoxicidade contra células leucêmicas. Portanto, apesar da sua atividade de glutaminase, a eficácia terapêutica da enzima pode ser melhorada através de tais mutações (Mehta *et al.*, 2014). A L-asparaginase de *E. coli* contém até 10% de atividade glutaminase. No entanto, as asparaginases de *Pyrococcus furiosus*, *Pseudomonas otitidis* e *Enterobacter cloacae* não possuem nenhuma atividade glutaminase, sendo que a de *P. otitidis* apresentou atividade contra células cancerígenas de forma comparável à enzima de *E. coli* comercial (Bansal *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 1967; Husain *et al.*, 2016). Estudos microscópicos e análise do ciclo celular sugerem que a enzima de *P. otitidis* induz morte celular por apoptose. Nesse estudo foi observada a perda do potencial de membrana mitocondrial, sugerindo que a enzima induz a morte celular pela via intrínseca de ativação da apoptose. Verificou-se também que essa enzima não é tóxica para as células não cancerosas humanas FR-2 e para linfócitos do sangue humano (Husain *et al.*, 2016b).

Para o sucesso da utilização da enzima terapêutica é necessária a sua elevada afinidade ao substrato (baixo valor de K_m), diminuição ou ausência de efeitos colaterais ou imunológicos e meia vida prolongada no plasma para diminuir a frequência de administração do medicamento (James *et al.*, 1966; Nagarethinam *et al.*, 2012; Parmentier *et al.*, 2015). Os valores K_m de L-asparaginases de diferentes microrganismos variam principalmente de 0,01 mM a 12 mM (Prajna *et al.*, 2016). Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a asparaginase II de *S. cerevisiae* são de 0,35 mM e 57,8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectivamente (Dunlop *et al.*, 1978). A enzima expressa por *Erwinia*

sp. possui K_m de 0,22 mM (Borkotaky e Bezbaruah, 2002). Já a asparaginase de *E. chrysanthemi* (Erwinase) e de *E. coli* (Kidrolase) possuem K_m de 0,09605 e 0,03306 mM, respectivamente (Phillips *et al.*, 2013). Já a asparaginase recombinante de *E. coli* K-12 possui os valores de 2,58 para K_m e 256 UI/mg para o $V_{m\acute{a}x}$ (Upadhyay *et al.*, 2014).

Outros requisitos são primordiais para a utilização da L-asparaginase no tratamento da LLA, tais como: o sangue humano possui pH ótimo de 7,4, uma enzima que possui K_m com valor mínimo sob tais condições de pH seria o ideal para sua atividade máxima, bem como à temperatura de 37°C, que é favorável para humanos (Ali *et al.*, 2015).

Algumas considerações importantes devem ser feitas em relação à utilização da asparaginase em humanos. A conversão da asparagina por essa enzima aumenta a concentração de ácido aspártico e amônia na corrente sanguínea, podendo ocasionar a diminuição do pH sanguíneo. Entretanto, o efeito da mudança do pH no sangue é algo ainda a ser explorado e mais estudos precisam ser feitos para neutralizar o efeito do ácido aspártico na corrente sanguínea (Ali *et al.*, 2015). Já o aumento da amônia na corrente sanguínea pode ocasionar a hiperamonemia, que acarreta o quadro de encefalopatia, podendo levar ao coma e até a morte (Clay & Hainline, 2007). A hiperamonemia sintomática não é mencionada nas recentes revisões da toxicidade ao tratamento com asparaginase (Muller e Boos 1998; Earl 2009; Rytting 2010).

A hiperamonemia foi observada em pacientes pediátricos submetidos à enzima PEG-asparaginase. Devido à meia-vida prolongada da PEG-asparaginase, as concentrações de amônia podem não voltar ao normal antes da próxima administração da dose e a toxicidade pode ser acumulada (Katja *et al.*, 2013; Nussbaum *et al.*, 2016). Nussbaum e colaboradores (2016) descreveram a hiperamonemia em um paciente tratado com a asparaginase de *Erwinia* (não peguilada). Pouco se sabe sobre o mecanismo exato através do qual a asparaginase causa hiperamonemia. Normalmente, a amônia é removida rapidamente da circulação por ser incorporada à glutamina no cérebro e nos músculos, e depois é convertida em ureia através do ciclo da ureia no fígado (Lockwood *et al.*, 1979).

1.3. Asparaginase no Brasil

Por mais de 30 anos, os hospitais do SUS adquiriram diretamente o medicamento Elspar, produzido pela Merck Sharp & Dome e, posteriormente, pelo laboratório Lundbeck, contendo asparaginase de *E. coli* não peguilada. Com a descontinuidade de sua produção em 2013, ocorreu o desabastecimento do medicamento (Ministério da Saúde, 2018). O Ministério da Saúde passou a adquirir a asparaginase e suprir os hospitais a partir de 2013, com o medicamento Aginasa, produto da empresa alemã MEDAC, representado pela Bagó. Esta, por sua vez, em 2016 comunicou a descontinuidade da produção mundialmente. Sem nenhuma empresa com registro no Brasil, foi realizada uma cotação internacional e o vencedor foi o Laboratório chinês Beijing S L Pharmaceutical Co, com o medicamento Leuginase, que, entretanto, sofreu diversas críticas quanto à sua qualidade e eficácia (Ministério da Saúde, 2018).

Com o registro no País, em 2017, do medicamento Oncaspar (PEG-asparaginase de *E. coli*), os hospitais oncológicos habilitados pelo SUS voltaram a ser responsáveis pela compra de asparaginase. A falta da asparaginase registrada no mercado entre 2013 e 2017 é uma situação infelizmente não rara, visto que diversas medicações antigas e relativamente de baixos custos, mas essenciais aos pacientes com câncer, têm sido retiradas do mercado brasileiro e mesmo mundial.

A produção desse biofármaco no Brasil permitiria que o País ficasse menos vulnerável à instabilidade da economia internacional e a outros problemas de importação referentes à conservação e manutenção dos produtos a partir das condições ideais de temperatura. Diminuiria também o risco de o País ser surpreendido pela suspensão da produção de um medicamento por um laboratório privado internacional, fato recorrente no Brasil (agencia.fiocruz.br, 2013). Havia uma expectativa para o ano 2015 do Ministério da Saúde (MS) de produzir nacionalmente a L-asparaginase disponibilizando-a para o SUS, com o investimento anual de R\$ 18 milhões na compra do produto (agencia.fiocruz.br, 2013). No entanto, ainda não houve avanços significativos na absorção dessa tecnologia.

1.4. Asparaginases

1.4.1. Asparaginases de *E. coli* e de *E. chrysanthemi*

Dois tipos de L-asparaginases bacterianas foram identificados: tipo I e tipo II (Campbell *et al.*, 1967). As L-asparaginases do tipo I são expressas constitutivamente no citoplasma e catalisam a hidrólise de L- asparagina e de L-glutamina, enquanto as L-asparaginases do tipo II são secretadas para o espaço periplasmático das membranas bacterianas e apresentam maior especificidade em hidrolisar L-asparagina (Campbell *et al.*, 1967; Cedar & Schwartz, 1968; Ali *et al.*, 2015). A L-asparaginase Tipo II de *E. coli* e de *Erwinia* é utilizada nos tratamentos antitumorais (Campbell *et al.*, 1967; Cedar & Schwartz, 1968; Kozak *et al.*, 2000). De acordo com Duval e colaboradores (2002), a L-asparaginase de *E. coli* é mais eficaz na clivagem da L-asparagina do que a L-asparaginase de *Erwinia* durante ao tratamento de LLA infantil.

A asparaginase de *E. coli* (L-asparagina amidohidrolase EC 3.5.1.1) possui quatro subunidades idênticas A, B, C, e D, sendo uma proteína homotetramérica (Kozak *et al.*, 2002), apresentando massa total de 136 – 150 kDa (Aung *et al.*, 2000, Girão *et al.*, 2016). Uma subunidade, contendo em torno de 336 aminoácidos, consiste em dois domínios α/β que são conectados pelas sequências ligantes. A interação entre as regiões N e C terminal dos monômeros adjacentes formam o sítio ativo. O domínio N-terminal compreende os resíduos 1-190 e está ligado ao domínio C-terminal menor (213-326) por um grande ligante (191-212) (Figura 2A). Os monômeros são capazes de associarem-se firmemente uns com os outros, formando dímeros íntimos caracterizados por uma extensa interface entre as subunidades que são mantidas juntas por várias interações, principalmente van der Waals e interações eletrostáticas (Figura 2B). Portanto, o tetrâmero de asparaginase pode ser tratado como dímero de dímeros porque o sítio ativo é criado pelas subunidades A e C ou B e D, onde cada um dos dímeros possui dois centros ativos, cada qual formado por cadeias laterais de aminoácidos das subunidades intimamente relacionadas aos encontrados em homodímeros (Figura 2C). Apesar dos dímeros conterem todos os elementos estruturais e grupos funcionais para criar um ambiente sítio-ativo completo, a enzima ativa é sempre um tetrâmero, e essa formação pode ser observada com a sobreposição de duas asparaginases de *E. coli* e *E. chrysanthemi* na Figura 2D (Swain *et al.*, 1993, Lopes *et al.*, 2015). O sítio ativo das asparaginases de *E. coli* e *E. chrysanthemi* é composto por resíduos de treonina, aspartato e lisina (Kim *et al.*, 1988).

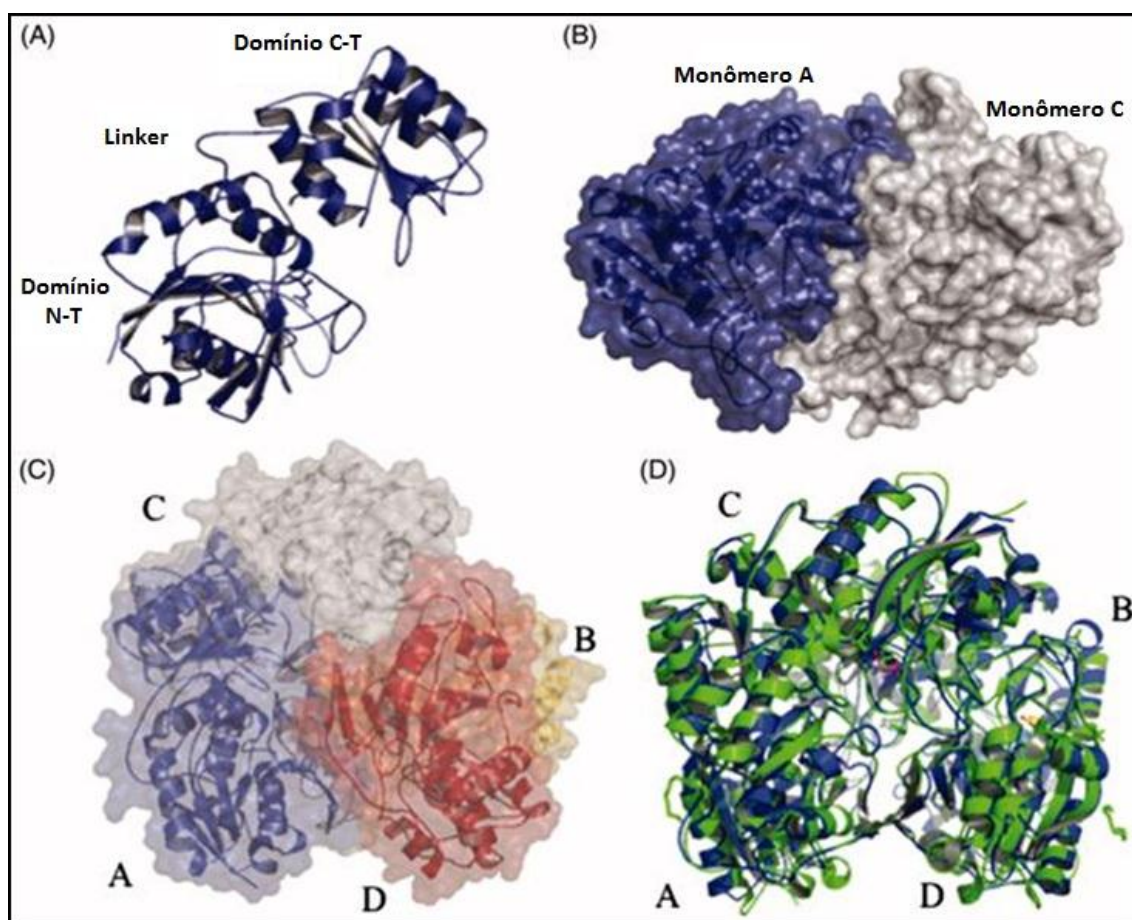


Figura 2. Aspectos estruturais da asparaginase bacteriana. **A)** Representação dos monômeros da asparaginase de *E. coli*, composto pelos domínios N-terminal e C-terminal unidos por um *linker*. **B)** Superfície molecular do dímero da enzima de *E. coli* nativa (EcA) com os monômeros em cores diferentes. **C)** Estrutura quaternária homotetramérica de EcA. **D)** Superposição de estruturas cristalográficas de asparaginase de *E. coli* e *E. chrysanthemi*. Gráficos moleculares foram gerados pelo software PyMOL (<http://www.pymol.org>) e as coordenadas 3ECA (*E. coli*) e 107J (*E. chrysanthemi*) do PDB (<http://www.rcsb.org>) (Modificada de Lopes *et al.*, 2015).

As asparaginases bacterianas possuem duas regiões altamente conservadas: a primeira inclui o resíduo de treonina 12 e a segunda inclui os resíduos de treonina 89 e aspartato 90 que fazem parte do sítio ativo. Outro resíduo que apresenta alto grau de conservação é a lisina 162 que também participa no mecanismo de catálise das asparaginases bacterianas. As maiores diferenças entre essas enzimas estão nas regiões de alças e regiões localizadas na superfície da molécula (Sanches *et al.*, 2007).

A análise da massa molecular em gel de SDS-PAGE da enzima recombinante de *E. coli* AS1.357, expressa em *E. coli*, possui 36 kDa, mesmo tamanho observado para a proteína nativa (Wang *et al.*, 2001). A faixa de pH e temperatura para a permanência da atividade é de 4,5 a 11,5 e 37°C, respectivamente (Stecher *et al.*, 1999). Já a L-asparaginase recombinante de *Erwinia carotovora* apresentou 39 kDa e pI de 9,04 (Wink *et al.*, 2010).

1.4.2. Asparaginases de outras fontes

A asparaginase é encontrada em uma variedade de organismos incluindo animais, células vegetais, leveduras, fungos e bactérias (Wang *et al.*, 2001; Mishra, 2006). No entanto, as propriedades destas enzimas variam de organismo para organismo (Narta *et al.*, 2007) e nem todas as L-asparaginases apresentam atividade antileucêmica (Van Den Berg, 2011). Na maior parte dos microrganismos, a L-asparaginase é encontrada como intracelular ou periplasmática. Há espécies que expressam a L-asparaginase com as formas periplasmática e citoplasmáticas no mesmo microrganismo (Schwartz *et al.*, 1966).

A expressão da L-asparaginase recombinante já foi reportada utilizando as seguintes plataformas de expressão: *E. coli* (Khushoo *et al.*, 2004; Oza *et al.*, 2011), *P. pastoris* (Ferrara *et al.*, 2010) e *Bacillus subtilis* (Mingmei *et al.*, 2013).

Na figura 3 pode ser observado o alinhamento de aminoácidos das asparaginases de *E. coli* com outras asparaginases de microrganismos distintos, incluindo a asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae*. O alinhamento da sequência de aminoácidos das asparaginases de *E. coli*, *E. chrisanthemi*, apresentou 37,9 e 43,7 % de identidade, respectivamente, com a asparaginase II de *S. cerevisiae* (Girão, 2017).

	1↓	*	20↓	*	40↓							
E.coli II	--LPNITILATGGTIAGGGDS	ATKSN	YTVGKVGVENLVNAV	PQLKDI	ANVKGEQVVNIG							
A.glut.II	--KNNVVIVATGGTIAGAGAS	STNSATYSAAKVP	VDALIKAVPQVNDLANIT	GIQALQVA								
Er.chry.II	DKLPNIVILATGGTIAGSAAT	GTQTTGYKAGALGVD	TLINAVPEVKKLANVKGE	QFSNMA								
S.cere II	SSLPSIKIFGTGGTIASKGST	SATTAGYSVGLT-VND	LIEAVPSLAEKANLDYLQ	VSNGV								
B. sub.I	--MKKLLMLTTGGTIAS----	VEGENGLAPGVK-ADE	LLSYVSKLDNDYTMETQ	SLMNID								
E.coli I	MQKKSIIYVAYTGGTIGMQ-R	SEQGYIPVSGHLQRQL	ALMPEFHRPEMPDFTI	HEYTPLMD								
	*60↓	80↓	**	100↓								
E.coli II	SQDMNDNVWLT	LAKKINTDCDK--	TDGEVITHGTD	TMEETAYFLD	LTVK-CDKPVVMVGA							
A.glut.II	SESITDKELLS	LARQVNDLVKKPSV	NGVVIHGTDT	TMEETAFFLN	LVVH-TDKPIVLVGS							
Er.chry.II	SENMTGDVVL	KLSQRVNELLARDD	DVGVVIHGTDT	VEESAYFLHL	TVK-SDKPVVFVAA							
S.cere II	NSLNTHLIP	LYHGISEALASDDY	AGAVVTHGTD	TMEETAFFLD	LITN-SEKPVCSIGA							
B. sub.I	STNMQPEYW	VEIAEAVKENYDA--	YDGEVITHGTD	MAYTSAALS	YMLQHAKKPIVITGS							
E.coli I	SSDMTPEDW	QHIAEDIKAHYDD--	YDGEVILHGTDT	MAYTASAL	SFMLENLGKPVIVTGS							
	120↓	140↓		160↓	*							
E.coli II	MRPSTSM	SADGPF	NLYNAVVTAA	DKASANRGVL	VVMNDTVLDGRDVT	KTNT T	DVA	TFKSV				
A.glut.II	MRPSTALS	SADGPLNL	YSAVALASS	NEAKNGVM	VLNDSIFA	ARDVTKGINI	HTHAFVS-					
Er.chry.II	MRPATAI	SADGPMNL	LEAVRVAGD	KQSRGRGV	MVVLNDRIGS	ARYITKTNA	STLDT	FKAN				
S.cere II	MRPATATS	SADGPMNL	YQAVSIAA	SEKSLGRGT	MITLNDRIAS	GFWTKMNA	NSLD	TFRAD				
B. sub.I	QIPITFQ	KTDARKNI	TD	AIRFACE	GVG--	GVYVFDGR	VIQ	GTRAIKLR	TKSYDAFESI			
E.coli I	QIPLAEL	RSQGQIN	LLNALY	VAANYPIN--	EVT	LFFN	NRLYR	GNRTTK	AHADGFD	AFASP		
	180↓	200↓		220↓								
E.coli II	NYGPLGYIHNGKIDYQRT	PAR	KHSTSDTP	FDVSKLN---	ELPKVG	IVNYANA-	SDLP	AKA				
A.glut.II	QWGALGT	LVEGKPYW	FRSSVKKH	TNNSEFNI	EKIQG-DAL	PGVQIVY	GSDNM-M	PD	AYQA			
Er.chry.II	EEGYLG	VIIIGNRI	YYQNRI	DKLHTR	SVF	DVRGLT---	SLPKV	DILY	GQDD-PEY	LYDA		
S.cere II	EQQYLG	YFSNDD	VEFYPP	VKPN-GW	QFFDIS	NLTPSEI	PEVILY	SYQGL	NPELIVKA			
B. sub.I	NYPYIA	FINE	DGIEYN	KQVTE	PENDTFT	VDTS	SLCT-----	DVCL	LKHPGL-K	PEMFDA		
E.coli I	NLPPL	LEAG-I	HIRRLN	TPPAPH-	GEGELI	VHPITP---	QPIGV	VTIY	PGI-SAD	VVRN		
	240↓	260↓		280↓	*							
E.coli II	LVDAGY	DGIVSAG	VGNGLY---	KSVF	DTLATA	AKTGTAV	VRRSSR-	VPTG--	AT	TQD	AEV	
A.glut.II	FAKAGV	KAIHAG	TGNGS	MAN--	YLV	PEVRKL	HDEQGL	QIVR	SSR-VA	QG--FV	LRNAEQ	
Er.chry.II	AIQHGV	KGIVYAG	MGAGSV	SV--	RGI	AGMR	KAMEK-	GVV	VIRSTR-	TGNG--	IVPPDEEL	
S.cere II	VKDLG	AKGIVL	AGSGAG	SWTA--	TGS	IVNEQ	LYEEY	GIP	IVHSRR-	TADG--	TVPPDDAP	
Bsub.I	LKSM-Y	KGIVIES	YSGG	VPFEG	RDIL	SKVNE	LIESG	IVV	ITTQC	LEE	GEDMSI	YEVGR
E.coli I	FLRQP	VKALIL	RSYGV	GNAPQ-	NKA	FLQEL	QEASDR	GIV	VVNLT	QC	MSGKVN	MGGYATGN
	300↓	320↓										
E.coli II	DDAKYGF	VASGTL	NLPQ	KARVLL	QLALT	QTKDP	QQIQ	IFN-QY-----				
A.glut.II	PDDKYG	WIAA	HLNLP	QKARLL	MLALT	TKTND	AKEIQ	NMF	W-NY-----			
Er.chry.II	PG-----	LVSD	SLNPA	HARILL	MLAL	TRTSD	PKVI	QY	FH-TY-----			
S.cere II	EYA----	IGSGY	LNPQ	KSRILL	QLCLY	SGYMD	QIRSV	SGV	YG-----			
B. sub.I	RVNQD	LIIRSR	NMTEA	IVPKL	MWAL	GQSSD	LPV	KRIM	ETPIAD	DDVVL--		
E.coli I	ALAHAG	VIGG	ADMT	VEATL	TKLH	YLLSQ	ELDTET	IRK	AMSQN	LRGEL	TPDD	

Figura 3. Alinhamento da sequência de aminoácidos de diferentes asparaginases microbianas. As sequências conservadas estão marcadas em cinza. Os resíduos de aminoácidos envolvidos na formação do tetrâmero na asparaginase de *E. coli* tipo II estão mostradas em negrito. Resíduos de aminoácidos presentes na interface B/C ou A/D estão sublinhados. Resíduos de aminoácidos presentes na interface B/A ou D/C estão pontilhados. Resíduos de aminoácidos presentes em todas as interfaces estão sublinhados por uma linha dupla. Os resíduos importantes para a catálise estão marcados por *. As sequências mostradas são: *E. coli* II - asparaginase II de *E. coli*, *A. glutam* II - glutaminase-asparaginase (Tipo II) de *Acinetobacter glutaminasificans*, *Er. chry.* II - asparaginase (Tipo II) de *E. chrysanthemi*, *S. cere* II - Asparaginase (Tipo II) de *S. cerevisiae*, *B. sub.* I - asparaginase (Tipo I) de *Bacillus subtilis* e *E. coli* I - asparaginase (Tipo I) de *E. coli* (Adaptado de Verma, 2007; apud D’Andrea, 2012).

L-asparaginase também foi relatada em *Zymomonas mobilis*. O gene sintético otimizado para os códons de uso em *E. coli* foi clonado e expresso nesta bactéria. A enzima foi expressa tanto extracelular quanto intracelular com rendimento de 0,13 UI/mL e 3,6 UI/mL, respectivamente. A enzima extracelular apresentou atividade antileucêmica em células cancerígenas (Einsfeldt *et al.*, 2016).

Dash e colaboradores (2016) descreveram a asparaginase de *Actinomycetales bacterium* com cerca de 57 kDa. A enzima foi purificada com atividade específica de 204,37 U/mg com 3,5% de rendimento. A enzima purificada apresentou atividade máxima em pH 10,0 e estabilidade em pH 7,0 a 9,0, sendo ativada por manganês e fortemente inibida por bário.

Uma espécie de *Streptomyces ginsengisoli*, isolada de sedimentos de rios de várias regiões na Índia, foi avaliada quanto a produção extracelular da enzima L-asparaginase. Para isso, foram realizados estudos de otimização do crescimento e produção da L-asparaginase que resultou em torno de 3,23 $\mu\text{mol/mL/min}$ de produtividade enzimática. O efeito de várias condições de cultivo na produção de L-asparaginase foi estudado. Das condições testadas, a glicose, seguida de amido e a peptona serviram como boas fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, para a produção máxima da enzima em pH 8 (Deshpande *et al.*, 2014).

A L-asparaginase de *Streptomyces tendae* foi expressa de forma nativa com ótimos rendimentos em meio de cultura com pH inicial 7,0 a 30°C por 72 h. A enzima foi purificada por precipitação com sulfato de amônio, filtração em gel de Sephadex G-100 e CM-Sephadex G-50. Após análise por eletroforese, a massa molecular da enzima foi registrada como 97,4 kDa (Kavitha & Vijayalakshmi, 2010).

A asparaginase I de semente de *Phaseolus vulgaris* foi purificada e livre de atividade glutaminásica, o que pode reduzir a possibilidade de efeitos colaterais durante a terapia antineoplásica. A enzima mostrou boa estabilidade em uma ampla variedade condições fisiológicas como pH e temperatura (Mohamed *et al.*, 2015). Esta enzima possui atividade *in vitro* e baixa imunogenicidade *in vivo* (Mohamed *et al.*, 2016).

Em *Arthrospira platensis* a L-asparaginase foi identificada predominantemente na região citoplasmática e sua produção pode ser induzida pelo emprego de condições combinadas de estresse com delineamento experimental que estudou os seguintes fatores: nitrogênio, ferro, cloreto de sódio e temperatura) (Prihanto & Wakayama, 2014).

Fungos filamentosos são outra fonte potencial de L-asparaginases. Os seres humanos estão mais intimamente relacionados a fungos em comparação com bactérias.

Assim, as chances de reação imunológica contra asparaginases de fungos poderia ser menor. Adicionalmente, estes microrganismos excretam a asparaginase, o que facilita o processo de purificação da enzima (Shrivastava *et al.*, 2012; Batool *et al.*, 2016). *Penicillium digitatum* foi utilizado para a produção de L-asparaginase extracelular. A enzima foi purificada cerca de 61 vezes e, em seguida, o estudo cinético mostrou que o valor de K_m da enzima era de 1×10^{-5} M. O pH e a temperatura ótimos para a enzima foram 7,0 e 30°C, respectivamente (Shrivastava *et al.*, 2012).

A produção da L-asparaginase foi investigada nos fungos filamentosos *Aspergillus tamaris* e *Aspergillus terreus*. Os fungos foram cultivados em meio contendo diferentes fontes de nitrogênio. *A. terreus* apresentou o maior nível de produção de L-asparaginase (58 U/L) quando cultivado com prolina a 2%. Ambos os fungos apresentaram o menor nível de produção de L-asparaginase na presença de glutamina e ureia como fontes de nitrogênio. Estes resultados sugerem que a produção de L-asparaginase por fungos filamentosos está sob regulação de nitrogênio (Sarquis *et al.*, 2004).

A L-asparaginase purificada a partir de microrganismos marinhos revelou excelente atividade e estabilidade em uma variedade de valores de pH. Possui alta afinidade pela asparagina e ausência de atividade glutaminásica. Por isso, destaca-se o potencial das L-asparaginases de fontes marinhas no tratamento da leucemia com efeitos colaterais minimizados. A termotolerância de algumas dessas enzimas também sugere seu potencial para aplicação no processamento de alimentos, convertendo asparagina em ácido aspártico durante o processo de cozimento e prevenindo a formação de acrilamida. No entanto, mais estudos são necessários para implementar a produção de L-asparaginase a partir de fontes marinhas (Izadpanah *et al.*, 2018).

O genoma humano é conhecido por codificar pelo menos três enzimas que podem hidrolisar a L-asparagina. A primeira enzima é chamada de lisofosfolipase que possui a função de hidrolisar lisofosfatidilcolina ligado à asparagina. Essa enzima tem alta homologia com a L-asparaginase bacteriana. A segunda é uma enzima chamada de aspartilglucosaminidase, que é lisossomal, e possui 60% de similaridade com a sequência de aminoácidos da asparaginase de planta. Tem baixa afinidade ao aminoácido L-asparagina, como substrato (K_m de 10^{-3} M), e funciona na degradação de glicoproteína pela clivagem de grupos de carboidratos ligados à L-asparagina. A terceira enzima é uma L-asparaginase humana (hASNase3). É semelhante à asparaginase de planta e também possui homologia estrutural com a L-asparaginase de *E. coli*. Nessa

enzima, a treonina desempenha um papel crucial na atividade da L-asparaginase (Nomme *et al.*, 2014).

1.4.3. Asparaginases de *S. cerevisiae*

As asparaginases de uma variedade de leveduras têm sido estudadas, especialmente as que são produzidas por *S. cerevisiae*, que são codificadas pelos genes *ASP1* e *ASP3* (Dunlop *et al.*, 1978; Bon *et al.*, 1997).

A cepa *S288c* de *S. cerevisiae* possui 5 genes (*ASP*) para expressão de isoformas da asparaginase. Uma única cópia do gene *ASP1* está presente no cromossoma IV e quatro cópias do gene *ASP3*, organizadas em tandem, estão localizadas no cromossoma XII (Jones, 1977a, b; Dunlop *et al.*, 1978; Sinclair *et al.*, 1994). Os dois *loci* relacionados aos genes que expressam a asparaginase, nomeados como *ASP* da levedura são evolutivamente relacionadas com os genes *ASP* de *E. coli*, que igualmente possuem distintas localizações das proteínas expressas: *ASP I* no citosol e *ASP II* na parede celular. No entanto, ambos os genes de levedura e bactéria são mais semelhantes entre si do que seus organismos homólogos, sugerindo que os genes que expressam as asparaginases eucarióticas e bacterianas provavelmente evoluíram por independentes eventos de duplicação (Sinclair *et al.*, 1994).

O gene *ASP1* é altamente conservado entre espécies de leveduras. Já o *locus* para o gene *ASP3* é exclusivamente presente em *S. cerevisiae* (Altschul *et al.*, 1997). Provavelmente, esse gene foi transferido horizontalmente ou uma relação muito próxima de *Wickerhamomyces anomalus* (normalmente conhecido como *Pichia anomala* e *Hansenula anomala*) para *S. cerevisiae* (League *et al.*, 2012).

O gene *ASP1* codifica uma asparaginase intracelular chamada de asparaginase I (Dunlop e Roon, 1975; Jones, 1977B). Essa enzima foi clonada e expressa em *E. coli* e purificada com atividade específica de 196,2 U/mg. A enzima purificada apresentou citotoxicidade para a linhagem celular leucêmica MOLT-4 (Costa *et al.*, 2016).

O gene *ASP3* codifica a asparaginase II periplásmica (Kim *et al.*, 1988). Considerando algumas propriedades bioquímicas e físico-químicas das duas isoformas de asparaginase produzidas por *S. cerevisiae*, a asparaginase II apresenta maior viabilidade para ser utilizada como medicamento, pois seu *K_m* é menor, sua estabilidade é maior e seu pH e temperaturas ótimos são próximos às condições fisiológicas (Dunlop *et al.*, 1978).

A asparaginase II apresenta 362 resíduos de aminoácidos (incluindo o peptídeo sinal) e sua massa molar deduzida por bioinformática é de 38 kDa (Protparam - <http://web.expasy.org/protparam/>). Apresenta uma sequência sinal de 25 resíduos de aminoácidos em seu N-terminal, que encaminha a enzima para o espaço periplásmico, onde é clivada (Dunlop *et al.*, 1978). Não foram encontradas na literatura informações sobre a massa molecular da proteína nativa.

No entanto, a asparaginase II recombinante expressa em *P. pastoris* foi purificada com atividade enzimática de 51 %, atingindo-se um grau de purificação de 11 vezes em relação ao extrato bruto. A atividade específica da enzima purificada foi 204,4 UI/mg, comparável à do medicamento Elspar (225UI/mg). Essa proteína recombinante apresentou duas isoformas de 48,6 e 44,6 kDa. Devido a presença de duas proteínas, foram observados dois valores de pH ótimo, um em pH 7,2 e outro em pH 9. A temperatura ótima, medida em pH 7,2 e em pH 9 foi de 46°C. No entanto, a atividade enzimática medida a 37°C apresentou resultados pouco abaixo da temperatura de 46°C, aproximadamente 92% em pH 7,2 e 90% em pH 9. A massa molecular da enzima nativa, estimada por cromatografia de exclusão molecular, foi de 136 kDa, sugerindo ser uma proteína com estrutura trimérica ou tetramérica (Girão *et al.*, 2016).

Em relação ao sítio ativo da asparaginase expressa por *S. cerevisiae*, a mesma possui os mesmos resíduos de treonina, aspartato e lisina que as enzimas de *E. coli* e *E. chrysanthemi* (Kim *et al.*, 1988).

Por ser originada de um eucarioto, espera-se que a asparaginase II de *S. cerevisiae* apresente potencial imunogênico inferior ao das enzimas bacterianas. Contudo, seus níveis de produção são bastante baixos (115 UI/g de célula) (Ferrara *et al.*, 2006), tornando atraente a clonagem do gene *ASP3* em outras plataformas de expressão visando aumentar os níveis de expressão.

1.5. Produção de proteínas recombinantes em *E. coli*

Não há dúvida de que a produção de proteínas recombinantes em sistemas microbianos revolucionou a bioquímica. Os dias em que foram necessários quilogramas de tecidos animais e vegetais ou grandes volumes de fluidos biológicos para a purificação de pequenas quantidades de uma determinada proteína praticamente desapareceram. Todo pesquisador que embarca em um novo projeto que precisará de uma proteína purificada, pensa imediatamente em como obtê-lo de forma recombinante. A capacidade de expressar e purificar a proteína recombinante desejada em grande

quantidade permite sua caracterização bioquímica, seu uso em processos industriais e o desenvolvimento de bens comerciais (Rosano & Ceccarelli, 2014).

E. coli é um dos organismos de escolha para a produção de proteínas recombinantes. Sua maquinaria celular é bem estabelecida e se tornou a plataforma de expressão mais popular. Por essa razão, existem muitas ferramentas moleculares e protocolos disponíveis para a produção de alto nível de proteínas heterólogas, como um vasto catálogo de plasmídeos de expressão, um grande número de cepas modificadas e muitas estratégias de cultivo (Rosano & Ceccarelli, 2014).

A utilização de *E. coli* como organismo hospedeiro é bem conhecida, possui pequeno tempo de duplicação (20 minutos), altos níveis de expressão de proteínas heterólogas, crescimento em meio de cultura de baixo custo, disponibilidade de um grande número de vetores de clonagem e de cepas hospedeiras, acúmulo rápido de biomassa e simples processo de escalonamento (Terpe *et al.*, 2006; Sezonov *et al.*, 2007).

A superexpressão de proteínas recombinantes em *E. coli* frequentemente resulta na formação de corpos de inclusão inativos, insolúveis. Estes corpos de inclusão, que contêm as proteínas recombinantes numa forma altamente enriquecida, podem ser isolados por separação sólido/líquido. Após a solubilização, as proteínas ativas podem ser geradas através de um processo de reenovelamento adequado. Na última década, estratégias e métodos específicos foram desenvolvidos para reenovelar proteínas recombinantes ativas a partir de corpos de inclusão. Desenvolvimentos recentes no procedimento de renaturação incluem a inibição da agregação durante o reenovelamento pela aplicação de aditivos de baixo peso molecular e técnicas de renaturação (Fang and Huang 2001).

Há várias estratégias para aumentar a expressão solúvel em *E. coli* incluindo o tipo de estirpe hospedeiro, a temperatura de expressão da proteína recombinante, o tratamento com choque térmico, estresse pela adição de etanol antes da indução da proteína e adição de osmólitos (sacarose, sorbitol, glicerol, glicina, Triton X-100) (Yu *et al.*, 2016; Mohammadinezhad *et al.*, 2018).

A taxa de produção microbiana de proteínas e compostos bioativos depende amplamente dos fatores de crescimento ou necessidades nutricionais e das condições ambientais que variam de organismo para organismo, incluindo pH, temperatura, aeração, tempo de fermentação, etc. Depende da natureza do microrganismo selecionado para a produção. Pode-se otimizar os parâmetros do processo e os componentes do meio para um melhor rendimento do produto desejado no biorreator.

Nem todas as proteínas nativas possuem propriedades ideais para sua aplicação em processos industriais. As propriedades funcionais de cada proteína precisam ser caracterizadas após o processo de purificação e melhorias adicionais nas características podem ser alcançadas principalmente através de engenharia de proteínas e engenharia de células hospedeiras para melhor expressão de proteínas recombinantes (Vidya *et al.*, 2017).

1.6. O projeto Asparaginase

Para superar a baixa produção de asparaginase II em *S. cerevisiae*, em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa, o gene *ASP3* (região correspondente aos aminoácidos 33 a 362) foi expresso com sucesso na levedura metilotrófica *P. pastoris* sob o controle do promotor do gene *AOX1*, obtendo-se uma enzima periplásmica que mostrou ser glicosilada, de acordo com as propriedades intrínsecas desta levedura de glicosilar proteínas extracelulares. O rendimento enzimático por massa celular seca para a cepa recombinante de *P. pastoris* atingiu 800 U/g, sete vezes maior do que o obtido para *S. cerevisiae*. Posteriormente, o cultivo em biorreator com alta densidade celular resultou em um rendimento volumétrico de 85.600 U/L e produtividade volumétrica global de 1083 U/Lh (Ferrara *et al.*, 2006).

Foram desenvolvidos dois processos para a extração da enzima periplásmica produzida pela linhagem de *P. pastoris* recombinante: tratamento da biomassa com 6 ciclos de congelamento/descongelamento seguido de extração com tampão fosfato, com recuperação de asparaginase em torno de 85% e de extração alcalina em presença de cisteína, com valores de recuperação de atividade na faixa de 90 % com 2 horas de tratamento. O extrato bruto da asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante mostrou-se estável à estocagem por dez meses em congelador (Ferrara *et al.*, 2010).

A asparaginase recombinante expressa em *P. pastoris* foi purificada à homogeneidade por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex G-200, seguida de cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q, obtendo-se recuperação de 51,3 % de atividade e atividade específica de 204 UI/mg. A massa molecular estimada foi de 136 kDa (em condições nativas) e 48,6 kDa e 44,6 kDa (sob condições redutoras), sugerindo uma estrutura oligomérica. A principal diferença entre os monômeros parece ser o seu grau de glicosilação (Girão *et al.*, 2016). Possui ponto isoelétrico de 4,5 e atividade máxima a 46°C e pH 7,2, retendo 92 % da atividade a

37°C. Análises por dicroísmo circular e de fluorescência mostraram que a enzima possui a estrutura predominantemente α -hélice com a contribuição de folha β e que permanece estável até 45°C em pH 6 a 10 (Girão *et al.*, 2016; Girão, 2017). Mesmo após desglicosilação, a atividade enzimática não aumentou. Os resultados de fluorescência para fosfoproteínas sugerem que essa enzima não é fosforilada (Girão, 2017).

Foi desenvolvida uma metodologia escalonável de purificação com as seguintes etapas em sequência: cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose CL-4B e cromatografia de troca iônica em coluna Capto-Q. Após essas etapas, a análise por SDS-PAGE demonstrou homogeneidade para as frações contendo asparaginase. Com o uso desta metodologia de purificação, a recuperação da atividade enzimática foi de 66,1%, atingindo-se um grau de purificação de 4,1 vezes em relação ao extrato bruto. A atividade específica da enzima purificada foi de 336,9 UI/mg (Girão, 2017).

Em testes *in vitro*, a asparaginase recombinante de *S. cerevisiae* inibiu a proliferação de células leucêmicas K562 (Girão *et al.*, 2016), mostrando seu potencial para uso terapêutico.

Adicionalmente, foi desenvolvida uma formulação inovadora para a asparaginase que apresentou atividade contra células leucêmicas Jurkat equivalente à da enzima comercial e retenção de 82% da atividade enzimática após 37 dias de estocagem a 4 °C. Encontra-se em fase de redação o pedido de patente para o processo.

Portanto, o conjunto de resultados obtidos até o momento indica que as características da asparaginase II de *S. cerevisiae* podem resultar em uma alternativa para a terapia em pacientes que desenvolveram hipersensibilidade ao tratamento da LLA com enzimas nativas ou recombinantes bacterianas.

2. JUSTIFICATIVAS

Apesar de efetiva para a terapia da LLA, as asparaginases de *E. coli* e de *E. chrysanthemi* apresentam limitações relacionadas à sua origem bacteriana, podendo provocar sérias reações imunológicas. Além disto, provocam diversos efeitos colaterais, associados em parte à capacidade das asparaginases bacterianas de hidrolisar também a glutamina. Outro fator limitante é a sua curta meia-vida plasmática, tornando necessárias aplicações sucessivas.

No Brasil, a asparaginase integra a lista de produtos estratégicos para o Sistema Único de Saúde. Trata-se de medicamento importado, sendo esta uma posição desconfortável, considerando a dependência do mercado externo e tecnológica, que tem causado, não raramente, desabastecimento do produto no País. Ressalta-se que o princípio ativo do medicamento disponível no mercado brasileiro, até o início deste ano, era a asparaginase livre (não peguilada) de *E. coli*.

A eficácia da L-asparaginase foi discutida nos últimos 40 anos e a busca de outras fontes de asparaginase visando o desenvolvimento de um biofármaco alternativo/inovador tem sido objeto de interesse em todo o mundo. Não obstante, um substituto ideal para a enzima ainda não foi desenvolvido (Ali *et al.*, 2016). A disponibilidade de um grande número de novas L-asparaginases com propriedades antigênicas variadas pode levar a estudos comparativos quanto à relação entre estrutura, atividade, imunogenicidade e propriedades anticancerígenas, o que, por sua vez, pode levar ao desenvolvimento de novos medicamentos e regimes terapêuticos personalizados baseados em cada requisito individual (Prajna *et al.*, 2016).

A busca de novas asparaginases ainda é importante para clínicos e biotecnologistas. Além disso, a busca de fontes naturais e a produção de novas formas modificadas de asparaginases por engenharia de proteínas e tecnologias genéticas são provavelmente as abordagens mais poderosas para melhorar os potenciais terapêuticos da enzima (Covini *et al.*, 2012).

A asparaginase II de *S. cerevisiae*, codificada pelo gene *ASP3*, é uma enzima periplásmica glicosilada, que apresenta elevada estabilidade, pH e temperatura ótimos próximos às condições fisiológicas. Por ser originada de um eucarioto, espera-se que apresente potencial imunogênico inferior ao das enzimas bacterianas. Contudo, seus níveis de produção são bastante baixos (115 UI/g de célula), tornando atraente a clonagem do gene *ASP3* em microrganismos hospedeiros visando aumentar os níveis de expressão. Em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, o gene *ASP3* (região correspondente aos aminoácidos 33 a 362) foi clonado com sucesso na levedura metilotrófica *P. pastoris* sob o controle do promotor *AOX1*, obtendo-se uma enzima periplásmica que mostrou ser glicosilada, de acordo com as propriedades intrínsecas desta levedura de glicosilar proteínas extracelulares. A enzima expressa em *P. pastoris* apresentou atividade antiproliferativa contra células de leucemia mieloide crônica K562, mostrando seu potencial para uso terapêutico.

É conhecido que a glicosilação exerce influência na estrutura, função, imunogenicidade e estabilidade da molécula, fatores esses de grande relevância para uma proteína terapêutica. A presença da porção glicídica em proteínas em geral aumenta a sua estabilidade, sendo por vezes crucial para garantir a conformação espacial correta da molécula e, por conseguinte, a sua atividade biológica. Por outro lado, a glicosilação pode ser fonte de efeitos imunogênicos.

Assim, existe interesse de realizar a clonagem do gene *ASP3* em *E. coli* visando a obtenção de uma proteína não glicosilada, de acordo com as propriedades intrínsecas das bactérias de não realizarem modificações pós-traducionais.

3. OBJETIVOS

3. 1. Objetivo geral

Expressar a asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* em *Escherichia coli* a partir da clonagem do gene *ASP3*.

3. 2. Objetivos específicos

- ✓ Comparar a expressão do gene *ASP3* em *E. coli* a partir de duas construções plasmidiais: pET28a (expressão intracelular) e pET22b (expressão extracelular);
- ✓ Desenvolver uma metodologia de purificação que preserve a atividade específica da proteína recombinante purificada;
- ✓ Determinar massa molar, pI e atividade glutaminásica da asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *E. coli*.
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral da proteína recombinante em ensaios de atividade *in vitro* utilizando células de linhagens cancerígenas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismos utilizados

As linhagens de *S. cerevisiae* e *E. coli* utilizadas nesse trabalho encontram-se descritas abaixo.

- *S. cerevisiae* - S288c (utilizada para extração de DNA genômico)

RE1006: MATa *can1-100 his3-his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52*.

- *E. coli*

DH5α: utilizada para a propagação e amplificação plasmidial. *ø80 ΔlacZΔM15 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rk- mk+) SupE44 relA1 deoR Δ(lac ZYA – arg I) u169* (Amersham Biosciences, USA).

BL21 (DE3): utilizada para a expressão da proteína recombinante {(F⁻*ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) recA1 gal dcm_(DE3) (lacI lac UV5-T7 gene 1 ind1 Sam7 nin5)*} (Novagen, USA).

4.2. Meios e soluções

Meio Luria-Bertani (LB): triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L. O pH foi ajustado para 7,0. Para o preparo de meio sólido, 1 L do meio LB líquido foi acrescido de 15 g de ágar bacteriológico. Posteriormente, o meio foi esterilizado em autoclave durante 30 minutos a 121°C e foi estocado a 25°C.

Meio TB: triptona 12 g/L; extrato de levedura 24 g/L; glicerol 4 mL/L; K₂HPO₄ 12,54 g/L e KH₂PO₄ 2,54 g/L. O pH foi ajustado para 7,0. Posteriormente, o meio foi esterilizado em autoclave durante 30 minutos a 121°C e foi estocado a 25°C.

Meio YPD: extrato de levedura 10g/L, peptona 20 g/L e dextrose 20 g/L. Posteriormente, o meio foi esterilizado em autoclave durante 30 minutos a 121°C e foi estocado a 25°C, pH 6,0.

4.3. Plasmídeos pET28a(+) e pET22b(+)

Os vetores de expressão do sistema pET (*Novagen*) utilizados no presente trabalho foram o pET28a (+) (Figura 4), para expressão citoplasmática e que possui o cassete de resistência à canamicina, e o vetor pET22b (+) (Figura 5), para expressão extracelular e que possui o cassete de resistência à ampicilina. O vetor pET22b possui uma sequência sinalizadora (peptídeo sinal) *pelB* (peptídeo sinal nativo de *Erwinia carotovora*), que auxilia a exportação da proteína para o espaço periplasmático, de onde poderá ser secretada para o meio de cultivo através de transporte passivo.

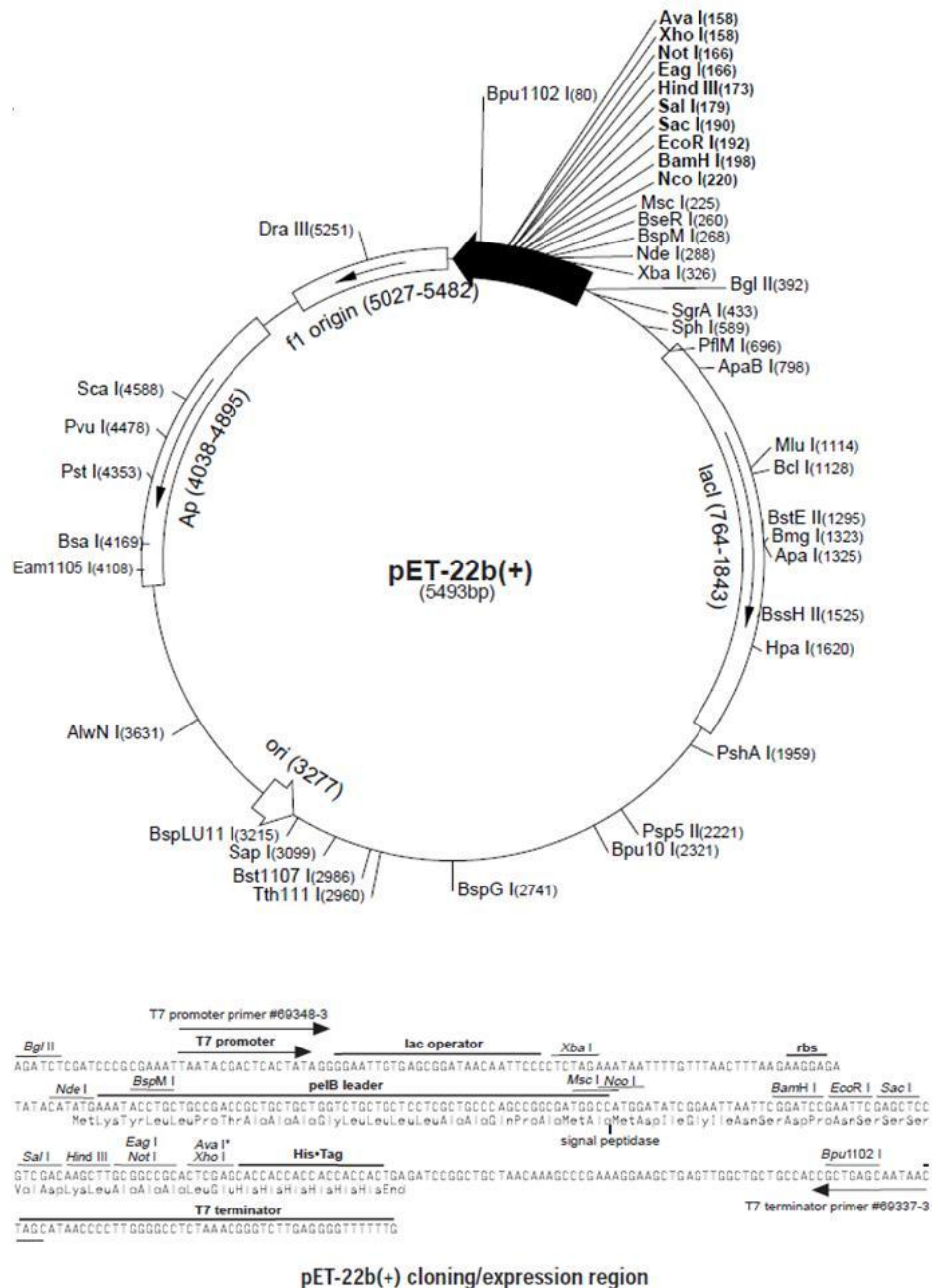


Figura 5. Mapa do vetor de expressão pET-22b (+) (Novagen) mostrando as regiões de clonagem e expressão. Apresenta uma origem de replicação bacteriana (*ori*), um centro múltiplo de clonagem ou *polylinker* que contém os sítios de restrição enzimática, gene que confere resistência à ampicilina (*Ap*) e promotor *T7 lac* (fundido ao operador do gene *lac*) o que possibilita a indução da expressão da proteína recombinante por isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Também pode ser visualizada a sequência gênica *pelB* que sintetiza o peptídeo sinal que facilita a exportação da proteína recombinante para o periplasma da célula.

4.4. Extração genômica de *S. cerevisiae*

Uma colônia da levedura *S. cerevisiae* (S288c) foi inoculada em 3 mL de meio YPD e cultivada a 28°C a 250 rpm por 24 horas. Quatrocentos microlitros dessa cultura foram adicionados a 40 mL de meio YPD em frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL. As células foram cultivadas por 24 horas, 250 rpm a 28°C. Depois do crescimento, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente e ressuspensas em tampão SE (sorbitol 0,9 M, EDTA 10 mM, pH 7,5). Em seguida, 100 µL de solução de liticase (Sigma) foram adicionados à amostra, incubando-se por 1 hora a 37°C. A suspensão foi centrifugada (5.470 xg por 5 minutos à temperatura ambiente) e as células foram ressuspensas em 3 mL de tampão TE20 (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 20 mM) acrescido de 0,5 mL de SDS 10%. A mistura foi incubada por 30 minutos, em seguida foi adicionado acetato de potássio 5 M (pH 8,9) e incubada no gelo por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada (15.120 xg por 10 minutos a 4°C) e o precipitado foi descartado. Ao sobrenadante foi adicionado um volume de clorofane e após uma leve homogeneização, a mistura foi centrifugada a 5.470 xg por 10 minutos. A fase aquosa, menos densa, foi recolhida para um novo tubo, recebendo 2,5 volumes de etanol 100%. Após ser incubada à temperatura ambiente por 5 minutos, a mistura foi centrifugada a 15.120 xg por 15 minutos a 4°C. Depois da centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 0,5 mL de tampão TE mais 5 µL de RNase A (*Invitrogen*, 10 mg/mL). O DNA total de levedura foi guardado a 4°C para uso ou a -20°C para estoque.

4.5. Iniciadores de DNA utilizados nas clonagens

Os iniciadores de DNA foram adquiridos da empresa *Exxtend solução em oligos* (<http://www.exxtend.com.br/>). Foram construídos a partir da sequência do gene que expressa a asparaginase II, depositado no GenBank: BK006945.2, selecionando-se a sequência de nucleotídeos correspondente aos aminoácidos 33 a 362. Os primers desenhados foram: Senso 5' CGCATATGCCATCAATCAAAATTTTGGT 3' e Anti-senso 5' CGCTCGAGTTAACCACCGTAGACGCCAGA 3'. A região de inserção dos sítios de restrição está sublinhada com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, respectivamente, as quais foram adicionadas para facilitar a clonagem do gene nos vetores de clonagem em *E. coli*.

4.6. Amplificação do gene *ASP3* de *S. cerevisiae*

O gene *ASP3* de *S. cerevisiae*, que codifica a enzima asparaginase II, foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA genômico, utilizando a enzima e protocolo da *Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen)*, e os iniciadores descritos no item 4.5. O programa utilizado para a amplificação foi: **desnaturação inicial** a 94°C por 3 minutos seguido pela **desnaturação** a 94°C por 1 minuto e **anelamento** a 68°C por 1 minuto e **extensão** a 72°C por 1 minuto com o total de **35 ciclos**. A extensão final prosseguiu a 72°C por 10 minutos e o fragmento amplificado do gene foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1%.

4.7. Digestão do DNA com enzimas de restrição

Para a digestão dos plasmídeos ou produtos de amplificação com enzimas de restrição, foram feitas misturas de reação em volumes de 20 µL (no caso de análise de restrição) ou 100 µL (para preparação dos vetores e insertos para os experimentos de clonagem e subclonagem), digerindo-se 2 ou 20 µL de DNA, respectivamente. A digestão foi realizada em períodos de 2 a 4 horas, a 37°C. As enzimas utilizadas (descritas no próximo parágrafo) foram da *Life Technologies* com seus respectivos tampões de reação. Para estes procedimentos foram usados os protocolos descritos por Sambrook *et al.*, 1989 e também o protocolo do fabricante das enzimas de restrição.

Para a confirmação dos clones, os plasmídeos extraídos foram submetidos à digestão com as enzimas utilizadas nas etapas de clonagem. Para liberação do gene *ASP3* presente no vetor pET28a, foram utilizadas as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. Para o vetor pET22b, foram utilizadas as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. As digestões foram incubadas a 37°C por 2 horas e o resultado visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

4.8. Separação e recuperação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose

Em todos os casos de clonagem, tanto o fragmento do vetor como os insertos foram separados em géis de agarose (*Ultra pure da Life Technologies*), preparados em

concentração de 0,8 ou 1% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 8 mM, EDTA 0,2 mM, pH 8,0) e corados com brometo de etídio na concentração de 0,1 µg/mL.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados sob luz UV. As bandas de interesse foram cortadas com bisturi e colocadas em microtubos de 1,5 mL. A recuperação do DNA foi realizada utilizando-se o *kit Gel Extraction (QIAGEN)*, seguindo o protocolo do fabricante.

4.9. Ligação do fragmento de DNA no vetor pET28a

Todas as ligações do vetor de clonagem com o inserto de interesse foram feitas em um volume de 20 µL com 1 unidade da *T4 DNA Ligase (Life Technologies)* a 16°C, por 18 horas. Metade do volume de reação foi utilizada para a transformação de células competentes DH5α. O restante foi armazenado para fazer uma análise eletroforética da ligação ou para posterior transformação, quando necessário. Após a ligação do gene *ASP3* no vetor pET28a, o plasmídeo foi nomeado de pET28a-ASP^{II}.

4.10. Subclonagem do gene *ASP3* em pET22B

Após a confirmação do gene *ASP3* por sequenciamento, o inserto correspondente foi removido da construção pET28a-ASP^{II} com as enzimas *NcoI* e *XhoI* e ligado no vetor pET22b para expressão da proteína recombinante para o meio extracelular com o auxílio do peptídeo sinal *pelB*. Após a ligação do gene *ASP3* no vetor pET22b, o plasmídeo foi nomeado de pET22b-ASP^{II}.

4.11. Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Uma colônia de *E. coli* DH5α ou BL21 (DE3) foi coletada e inoculada em 5 mL de meio LB, sem antibiótico, o qual foi incubado a 37°C, durante 18 horas a 200 rpm. Em seguida, uma alíquota de 3 mL desta cultura foi inoculada em 300 mL de LB e incubada a 37°C, 250 rpm até atingir densidade ótica a 600 nm (DO_{600 nm}) entre 0,5 e 0,6. Uma vez alcançada a DO, a cultura foi resfriada em gelo por 30 minutos e redistribuída em seis tubos tipo Falcon com 40 mL de cultura em cada. Cada cultura foi centrifugada a 2.419 xg durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Para a lavagem do precipitado celular, foram adicionados 40 mL de solução de glicerol 10% estéril e refrigerada. Os tubos foram novamente centrifugados a 2.419 xg por 20

minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido mais três vezes e, após a última lavagem, o precipitado celular foi unificado e ressuspenso em 1 mL da solução de glicerol 10%. Alíquotas de 80 µL foram estocadas em freezer a -80°C.

4.12. Transformação de *E. coli* (DH5α e DE3) com os plasmídeos pET28A-ASPII e pET22B-ASPII e extração plasmidial

As construções pET28a-ASPII e pET22b-ASPII foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α e DE3 preparadas de acordo com o protocolo descrito no item 4.11. As transformações das cepas foram realizadas através de eletroporação em aparelho eletroporador *MicroPulser*TM (*Bio-Rad*), utilizando o protocolo descrito em seguida. Cubetas para eletroporação de 0,2 cm (*Bio-Rad*) e alíquotas de células eletrocompetentes foram mantidas em gelo por cerca de 5 min. Posteriormente, 3 a 5 µL de produtos de ligação, consistindo no fragmento de DNA ligado ao vetor de clonagem correspondente, ou plasmídeos purificados, foram incubados com 50 µL de células eletrocompetentes e mantidos em gelo por mais 5 minutos. Em seguida, a suspensão de células foi transferida para a cubeta e a eletroporação realizada utilizando o programa EC2 do aparelho. Imediatamente após a eletroporação, foram acrescentados à cubeta 1 mL de meio LB líquido sem antibiótico e as células eletroporadas foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL. A cultura foi incubada a 37°C por 1 h a 200 rpm. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio seletivo LB-ágar 1,5% contendo o antibiótico para o qual o vetor inserido e/ou a cepa confere resistência. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

Para purificação dos plasmídeos, as colônias de transformantes em DH5α foram selecionadas e crescidas em 5 mL de LB com os respectivos antibióticos a 37°C, 200 rpm por 16 horas. Para a extração de DNA plasmidial, foi utilizado o *kit QIAprep Spin Miniprep* (*Qiagen*). A separação do DNA plasmidial ocorre através de uma membrana de sílica presente dentro da coluna. Para realizar as extrações foram utilizados 5 mL da cultura de célula DH5α contendo o DNA plasmidial. Todas as etapas foram realizadas conforme o protocolo do fabricante. A eluição do plasmídeo aconteceu pela adição de 32 µL de água ultrapura estéril a 60°C. A solução contendo DNA plasmidial foi estocada a -20°C.

4.13. Análise de colônias/clones transformantes pela reação em cadeia da polimerase – PCR

A partir de uma colônia ou de 1 mL de crescimento recente em meio líquido dos clones selecionados, o conteúdo foi colocado em tubos de 1 mL e centrifugados. O pellet foi ressuspenso em 100 µL de água ultrapura (*Sigma*), aquecido por 10 minutos a 99°C e depois centrifugado a 27.260 xg por 1 minuto. Dois µL do sobrenadante foram utilizados para detecção da presença do gene da asparaginase II (*ASP3*) utilizando o protocolo da PCR descrito no item 4.6, utilizando-se os iniciadores descritos no item 4.3. Como controle positivo foi utilizado o DNA genômico de *S. cerevisiae*. O fragmento amplificado do gene foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1%.

4.14. Sequenciamento de DNA

Os sequenciamentos de DNA foram realizados pela Plataforma de Sequenciamento de DNA da Fundação Oswaldo Cruz. A reação de sequenciamento foi realizada segundo o método de término de cadeia de Sanger modificado (Sanger *et al.*, 1977), empregando dideoxinucleotídeos marcados com fluoróforos. As reações foram realizadas em volume final de 10 µL contendo 3,2 pmol de oligonucleotídeo iniciador, aproximadamente 200 - 250 ng do produto da PCR purificados/plasmídeo e 4 µL do reagente DYEnamic ET Sequence Premix Terminator (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences). O programa utilizado foi o seguinte: 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg, 60°C por 30 seg.

4.15. Expressão da asparaginase II em *E. coli* BL21 (DE3), utilizando as construções pET28a-ASPII e pET22b-ASPII

4.15.1. Expressão em pequena escala (3 mL)

Para verificar a expressão da proteína recombinante, foram utilizadas as linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) competentes, obtidas por transformação, conforme descrito no item 4.12. Colônias isoladas em placas de Petri contendo meio LB ágar foram inoculadas em 3 mL de meio LB suplementado com canamicina (40 µg/mL) quando utilizando o vetor pET28a-ASPII e ampicilina (100 µg/mL) para a construção

com o pET22b-ASPII. A cultura foi incubada a 37°C a 200 rpm, até obtenção da DO_{600nm} de 0,5. Um mL da cultura foi armazenado em tubo tipo *Eppendorf* para controle de células não induzidas. Ao volume restante da cultura foi adicionado IPTG (concentração final de 1 mM), incubando-se a seguir nas mesmas condições por um período adicional de 3 horas. Um mL foi coletado para controle de células induzidas. Os controles de não-indução e indução foram centrifugados por 1 minuto a 27.260 xg e ao pellet foram adicionados 80 µL de água ultrapura e 20 µL de tampão de amostra de proteína (azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM pH 6,8). As amostras foram fervidas por 15 minutos e aplicadas em gel de SDS-PAGE a 12% (10 µL de cada amostra).

Para aumentar a solubilidade da proteína ativa desejada utilizando a construção pET28a-ASPII, foram realizadas variações nas concentrações de IPTG e com a diminuição da temperatura. Foram estudadas as culturas, induzidas com 0,1, 0,5 e 1,0 mM de IPTG a 15°C, 20°C, 28°C e 37°C com adição de 5% de glicose. No entanto, apenas sob condições IPTG 0,1 mM de 15°C com 5% de adição de glicose foram ideais para a expressão solúvel de asparaginase II recombinante (dados não mostrados).

4.15.2. Expressão em frascos agitados (1 L)

Para a preparação dos cultivos em frascos agitados, foi utilizado um estoque de 1 mL de cada clone de *E. coli* BL21 (DE3) transformado com os plasmídeos pET28a-ASPII e pET22b-ASPII, separadamente, armazenados em glicerol 20% a -80°C. Os clones foram pré-inoculados em 50 mL de meio LB contendo os respectivos antibióticos e incubados a 37°C, 250 rpm por 16 horas. Após o crescimento celular, o volume foi inoculado em 1 litro de meio TB com o respectivo antibiótico em frasco Erlenmeyer de 4 L. A cultura contendo *E. coli* BL21 (DE3) pET22b-ASPII ficou a 250 rpm a 37°C até atingir a Abs_{600nm} de 0,6-0,9 sendo então adicionado IPTG com a concentração final de 1 mM. O meio foi incubado nas mesmas condições por 20 horas. Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação (5.470 xg por 15 minutos a 4 °C). O pellet celular foi congelado a -20°C para posterior análise. O sobrenadante da cultura foi armazenado a 4°C para posterior análise da exportação da proteína para o espaço periplasmático e extravasamento desta para o meio extracelular.

A cultura contendo *E. coli* pET28a-ASPII foi mantida a 37°C, 250 rpm até atingir DO_{600nm} de 0,5 - 0,6 e as células foram induzidas com IPTG na concentração

final de 0,1 mM e adição de glicose na concentração final de 5%. A cultura foi incubada à temperatura de 15°C, 250 rpm por 20 horas. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação (6.000 rpm por 15 minutos a 4°C).

Para a cultura contendo *E. coli* pET22b-ASPII a indução foi conduzida com IPTG (1 mM). O meio foi incubado nas mesmas condições por 20 horas. Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação (5.470 xg por 15 minutos a 4 °C). O pellet celular foi congelado a -20°C para posterior análise. O sobrenadante da cultura foi armazenado a 4°C para posterior análise da exportação da proteína para o espaço periplasmático e extravasamento desta para o meio extracelular.

O pellet celular (ambas as construções pET28a-ASPII e pET22b-ASPII) foi armazenado a -20°C para posterior análise (quantificação de proteínas e dosagem de atividade enzimática). No caso do cultivo com pET28a-ASPII, o sobrenadante da cultura foi descartado, por não apresentar expressão extracelular, confirmado por SDS-PAGE e análise enzimática. Já para a expressão utilizando pET22b-ASPII, foram recolhidos 10 mL do sobrenadante da cultura para quantificação de proteínas e dosagem de atividade enzimática e o volume restante foi estocado a 4°C para posterior purificação.

4.16. Lise celular e obtenção dos corpúsculos de inclusão da cultura utilizando a construção pET28a-ASPII

O pellet celular da construção pET28a-ASPII, obtido conforme descrito no item 4.13, foi descongelado e homogeneizado em tampão de fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0 na relação de 10 mL de tampão para cada grama de pellet celular (peso úmido). Em seguida, a suspensão bacteriana foi lisada a 800 bar por 10 minutos utilizando-se homogeneizador de alta pressão APLAB-10 Arte Peças. Após a lise celular, o material foi centrifugado para clarificação do material a 47.936 xg por 30 minutos a 4°C. A seguir, o sobrenadante, denominado fração solúvel e o pellet, contendo os corpúsculos de inclusão (CIs) foram congelados a -20°C para posteriores análises.

4.17. Reenovelamento (*refolding*) da asparaginase II expressa por *E. coli* pET28a-ASPII

Os corpúsculos de inclusão (CIs) foram diluídos em 20 mL de tampão de lavagem de CIs (fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0, sacarose 20%, solução comercial de

inibidor de protease 1 mg/mL (*Sigma*), lisozima 1 mg/mL (*Sigma*) e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Os CIs lavados foram centrifugados a 47.936 xg a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado três vezes com o tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 mais solução de inibidor de protease (*Sigma*) 1 mL/g e na quarta vez foi diluído em 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,02 M, que foi usado na solubilização e reenovelamento.

Os CIs contendo asparaginase II (1 mL) foram solubilizados em 9 mL de tampão de solubilização (ureia 4 M; fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0; β-mercaptoetanol 0,02 M, solução de inibidor de protease (*Sigma*) 1 mL/g, NaCl 0,01 M) por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. A asparaginase solubilizada foi centrifugada a 47.936 xg por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi filtrado através de filtro 0,22 µm (Millipore). A proteína solubilizada foi submetida ao reenovelamento em reator químico, utilizando 90 mL de tampão de *reenovelamento* (ureia 4M; fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0; arginina 0,1 M, NaCl 0,01 M) por diluição em um fluxo de 0,1 mL/minuto a 4°C. Após a diluição, o reenovelamento prosseguiu por mais 2 horas. Em seguida, centrifugou-se a 47.936 xg por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dialisado (membrana de 10 kDa) em tampão de diálise I (ureia 0,5; fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0) por 4 horas a 4°C, sendo depois alterado para o tampão de diálise II (fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0) por mais três vezes com intervalos de 4 horas. A proteína dialisada foi concentrada por ultrafiltração com membrana de 30 kDa (Amicon Ultra-15, Millipore) e centrifugação a 2.419 xg por 40 minutos a 4°C. Parte do volume obtido foi utilizada para realizar análise por SDS-PAGE e para determinar a atividade da proteína reenovelada. O restante foi usado para quantificação de proteína e purificação.

4.18. Purificação por afinidade a íons imobilizados (IMAC)

A purificação da asparaginase expressa em *E. coli* pET22b-ASPII foi realizada utilizando a coluna HisTrap (GE). Para a preparação da coluna foi realizada uma lavagem com solução contendo fosfato de sódio 0,02 M, NaCl 0,5M e de EDTA 0,05 M, seguida da lavagem com volume de tampão fosfato de sódio 0,02 M correspondente a 5 vezes o volume de coluna. A coluna foi carregada com íons níquel pela aplicação de NiSO₄ 0,1 M e, para a retirada do excesso de níquel, a coluna foi lavada com tampão fosfato de sódio 0,02 M.

O material obtido após a lise celular ou a partir do meio de cultura foi aplicado à coluna com uma solução de imidazol 0,04 M em fosfato de sódio 0,02 M pH 7,4. Após a passagem do extrato, a proteína foi eluída com um gradiente de 0 a 0,5 M de imidazol.

4.19. Purificação da proteína após o reenovelamento

Após todas as etapas do *reenovelamento* da asparaginase II expressa por *E. coli* - pET28-ASP^{II}, a proteína concentrada foi purificada por troca iônica utilizando a coluna de 5 mL Capto DEAE (GE). A amostra permaneceu em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0. A coluna foi equilibrada com 5 volumes de tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0. As proteínas que interagiram com a coluna foram eluídas com gradiente de NaCl (0 a 1 M) em tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0.

4.20. Purificação da asparaginase solúvel expressa por *E. coli* pET28a-ASP^{II}

Foram realizados dois processos distintos para a purificação da asparaginase, a primeira tentativa foi utilizada a purificação por troca iônica.

A fração solúvel foi purificada utilizando a coluna de troca iônica de 5 mL Capto Q (GE). A amostra permaneceu em tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0. A coluna foi equilibrada com 5 volumes de tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0. As proteínas que interagiram com a coluna foram eluídas com gradiente de NaCl (0 a 1 M) em tampão fosfato de sódio pH 7,0.

Para a purificação por afinidade, a fração solúvel foi aplicada à coluna com uma solução de imidazol 0,04 M em fosfato de sódio 0,02 M pH 7,4. Após a passagem do extrato, a proteína foi eluída com um gradiente de 0 a 0,5 M de imidazol.

4.21. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio – SDS-PAGE

Para a análise da expressão da proteína intracelular foram retiradas amostras de 1 mL antes da indução e ao final cultivo (3 horas de indução para expressão em 3 mL de meio LB e 20 horas para expressão em 1L em meio TB). Estas amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 26.260 xg à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em tampão de amostra para proteína. As amostras foram incubadas a 99°C por 15 minutos e aplicadas em gel de SDS-PAGE a 12% (acrilamida 29%, N, N' -

metilenobisacrilamida 1% em água deionizada). A corrida foi realizada por 90 minutos com voltagem de 120 V em tampão de corrida (Tris Base 3 g/L, glicina 14,5 g/L, SDS 0,1 g/L e pH 8,3) (Laemmli, 1970). O gel foi corado com Coomassie Blue R-250 0,25% e descorado com ácido acético 10% e metanol 50%. Após descorar, o gel foi fotografado para posterior análise.

Para a análise da expressão da asparaginase, amostras dos sobrenadantes dos cultivos, dos sobrenadantes obtidos após lise celular e da proteína obtida após *reenovelamento* foram centrifugadas e os sobrenadantes foram concentrados 10 vezes em unidades de ultrafiltração com membrana de 30 kDa (Amicon Ultra-15, Millipore) e por centrifugação a 2.419 xg por 40 minutos a 4°C. As amostras foram preparadas com 80 µL deste sobrenadante e 20 µL do tampão de amostra para proteína, sendo seguidos os mesmos procedimentos para aplicação em gel 12%.

4.22. Quantificação de proteína por Bradford

A quantificação de proteína total foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) em microplaca de 96 poços. Após incubação à temperatura ambiente por 5 minutos foi realizada a leitura de Abs_{595nm} das amostras utilizando o equipamento *SpectraMax* (Molecular Devices). A partir da curva padrão elaborada com proteína albumina do soro bovino - BSA (Bio Rad) foram determinadas as concentrações de proteína total das amostras.

4.23. Análise da atividade asparaginásica

A análise da atividade asparaginásica foi realizada conforme descrito por Einsfeldt (2014), com algumas modificações. A atividade enzimática foi mensurada através da hidrólise de asparagina em aspartato e amônio (Dunlop *et al.*, 1980), sendo que uma unidade internacional de L-asparaginase (UI) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de amônio por minuto a 37 °C e pH 7,4 (Guo *et al.*, 2002; Kurtzberg, 2000).

Para realizar as análises de atividade da enzima obtida de forma intracelular ou potencialmente no periplasma, foram utilizadas as células provenientes de 1 mL de cultivo que foi centrifugado a 27.260 xg por 1 minuto em temperatura ambiente, e depois adicionado 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4 gelado.

Para realizar as análises de atividade da enzima obtida no sobrenadante do cultivo (expressão extracelular), o sobrenadante, após lise celular e a parte final do reenovelamento, foi concentrado 10 vezes utilizando unidades de ultrafiltração com membrana de 30 kDa (Amicon Ultra-15, Millipore) e centrifugações a 2.419 xg por 40 minutos a 4°C. A amostra proveniente do meio de cultura livre de células foi previamente dialisada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4.

As reações foram realizadas com 50 µL da amostra adicionados a 50 µL de asparagina 5 g/L. A solução de asparagina foi preparada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4. Foram realizados controles para a confirmação da ausência de íons amônio no tampão, na amostra e para a determinação do valor de absorbância correspondente à molécula de asparagina, uma vez que esta também reage com os reagentes formadores de cor, independentemente do tempo de reação, mas dependente do número de moles de asparagina. Logo, o valor de absorbância correspondente ao controle de asparagina foi utilizado como branco para o cálculo da atividade enzimática.

O tampão referente ao controle foi preparado com 100 µL, o controle de asparagina foi preparado com 50 µL de asparagina 5 g/L e 50 µL de tampão fosfato 0,02 M pH 7,4 e os controles de amostra foram preparados com 50 µL de amostra e 50 µL de tampão fosfato 0,02 M pH 7,4. Todos os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos. Imediatamente após este tempo, 40 µL da reação e dos controles foram adicionados a 40 µL de TCA (ácido tricloroacético) 1,5 M. A estes 80 µL resultantes foram adicionados 2 mL do Reagente 1 (salicilato de sódio 60 mM, nitroprussiato de sódio 3,4 mM e EDTA dissódico 1,35 mM). A mistura foi agitada e depois foram adicionados 2 mL do Reagente 2 (hipoclorito de sódio 4,8 mM e hidróxido de sódio 150 mM). Em uma reação positiva, íons amônio na presença destes reagentes formam um composto cromógeno azul esverdeado (Tabacco *et al.*, 1979). As amostras foram então submetidas à leitura de Abs_{600nm} e, a partir de uma curva padrão, construídas com soluções de sulfato de amônio em diversas concentrações, foram determinadas as concentrações do íon amônio liberado durante a reação enzimática.

O cálculo foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$UI / mL = (\Delta Abs_{600nm} \times 2 \times diluição) / (FC \times t_{reação}).$$

4.24. Quantificação da massa celular

A avaliação do crescimento celular foi realizada conforme detalhado por Einsfeldt (2014), com algumas modificações, através de medidas de DO_{600nm} utilizando

espectrofotômetro (*Amersham Pharmacia Ultrospec 3100 Pro*). As leituras foram convertidas para massa seca de células. Sendo assim, uma curva de absorbância em função da concentração de células foi realizada para correlacioná-las.

A partir da cultura de 1L de pET28a-ASPII e pET22b-ASPII em meio TB, o volume foi centrifugado a 5.470 xg por 30 minutos a 4°C. O pellet de cada cultura foi ressuspenso em 20 mL de água ultrapura e centrifugado novamente a 5.470 xg por 30 minutos a 4°C. Este procedimento foi repetido três vezes. Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 50 mL de água ultrapura. Dez mL da suspensão celular resultante foram transferidos para placas de Petri previamente taradas (em triplicata). Essas placas foram armazenadas em estufa a 90°C para verificação e registro dos valores até a secagem dos pellets.

Simultaneamente, foram realizadas diluições seriadas com o volume restante de 20 mL das amostras. A DO destas diluições foi medida em espectrofotômetro, de modo a delinear um gráfico de DO_{600nm} em função da concentração de células, obtendo-se a equação que correlaciona DO_{600nm} com concentração de células da cepa *E. coli* pET28a-ASPII ($R^2=0,992$) e pET22-ASPII ($R^2=0,998$).

4.25. Digestão trípica em gel de poliacrilamida

As cadeias polipeptídicas reveladas como bandas nos géis de eletroforese unidimensional foram tripsinizadas conforme descrito abaixo. O procedimento foi realizado em uma cabine de segurança biológica para minimizar eventual contaminação e resultados não confiáveis. Depois de identificadas, as bandas foram cortadas, os pedaços de gel colocados em tubos tipo *Eppendorf* de 0,5 mL e descorados com solução de acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 por 24 horas, sob agitação. Em seguida, removeu-se o descorante e desidratou-se os pedaços de gel com 200 µL de acetonitrila 100% por 5 minutos e, então, secou-se em equipamento de secagem a vácuo (*Speedvac, SC110, Savant*), por cerca de 15 minutos.

Aos pedaços de gel secos foram adicionados 100 µL de ditioneitol (DTT) 65 mM, por 30 minutos a 56°C. Passado este tempo, removeu-se a solução redutora e adicionou-se 100 µL de iodoacetamida 200 mM, por 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. A solução foi removida e os pedaços de gel foram lavados com 200 µL de bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 minutos. Após remoção da solução de lavagem, os pedaços de gel foram submetidos a nova desidratação com 200 µL de

acetonitrila 100%. O procedimento de lavagem e desidratação dos géis foi repetido mais uma vez, secando-se a seguir os mesmos por 15 minutos em *speed-vac*.

Em paralelo, dissolveu-se em banho de gelo, 20 µg de tripsina (Promega) em 100 µL de ácido acético 50 mM, diluindo-se a seguir 10 vezes com solução de bicarbonato de amônio 40 mM. Adicionou-se 15 µL da solução resultante de tripsina (concentração final de 20 ng/µL) a cada tubo contendo os pedaços de gel, mantendo-se no gelo por 45 minutos, para que a tripsina penetrasse no gel sem que se iniciasse a digestão. Removeu-se, então, todo o excesso de tripsina e adicionou-se 20 µL de bicarbonato de amônio 40 mM. Incubou-se a 37°C por 20 horas.

As soluções dos peptídeos extraídos foram concentradas em *speed-vac* até o volume de aproximadamente 5 µL, sendo armazenadas em freezer a -20°C, para posterior análise por espectrometria de massas.

Para todos os ensaios deste tipo, utilizaram-se o padrão de massa molecular BSA como controle positivo (CP) e um pedaço de gel não corado como controle negativo (CN).

4.26. Análise de peptídeos por Espectrometria de Massas

Os peptídeos da digestão trípica foram analisados em espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF (*ABI 5800 Applied Biosystem*), no modo *reflectron*. As amostras foram misturadas com a matriz (composta de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico 10 mg/mL em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0,3%), na proporção de 1:1 (v/v). As misturas foram aplicadas individualmente na placa de MALDI (1 µL) e secas à temperatura ambiente. A placa de MALDI foi calibrada com uma mistura dos seguintes peptídeos: arg-bradiginina (m/z 904,46), angiotensina I (m/z 1.296,68), glu1-fibrinopeptídeo B (m/z 1.570,67), ACTH-(1–17) (m/z 2.093,08), e ACTH-(18–39) (m/z 2.465,19). No modo MS (primeira fragmentação), as massas (na realidade a relação m/z) dos íons observados correspondem às massas dos peptídeos obtidos pela digestão trípica da proteína e detectados no espectrômetro (mapa peptídico). No modo MS/MS (segunda fragmentação), os cinco íons mais abundantes foram selecionados (*timed ion selector*) e fragmentados, preferencialmente nas ligações peptídicas, por colisão com nitrogênio (*CID* ou *collision-induced dissociation*). As massas dos fragmentos gerados (MS/MS) foram submetidas à pesquisa no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) não-redundante (nr), com o auxílio do programa MASCOT (Matrix Science, Londres, Inglaterra). Os parâmetros usados na busca foram:

duas clivagens de tripsina perdidas, $\pm 0,8$ Da de erro no modo MS, $\pm 0,6$ Da de erro no modo MS/MS e modificações variáveis em relação à carbamidometilação (Cys), oxidação (Met) e pyro-Glu (N-terminal Glu). A especificação do instrumento para a busca de dados através de programa MASCOT foi “MALDI-TOF/TOF”. Finalmente, os resultados foram conferidos manualmente.

4.27. Determinação de massa molar por cromatografia de exclusão molecular

As amostras foram submetidas à cromatografia utilizando solução PBS, pH 7,0 em coluna Superdex 200 10/30 (24 mL). O fluxo foi de 0,5 mL/minuto e o volume de aplicação de 500 μ L, em equipamento AKTA Pure. A detecção foi realizada a 220 e 280nm. A coluna foi previamente calibrada com padrões de massa molecular conhecidos: Blue Dextran (2000kDa), Aldolase (150kDa), Conalbumina (75kDa) e Ribonuclease (13,7kDa). A massa molar foi calculada utilizando curva de calibração $y = -3,7412x + 4,7187$. $R^2 = 0,9967$.

4.28. Focalização Isoelétrica

As amostras não foram diluídas para a realização do experimento. O ponto isoelétrico (pI) foi estimado por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE), conforme Phamacia Biotech (1990). Foi utilizado um gel pronto PhastGel® (GE Healthcare) com gradiente de pH 3 a 9. Foram utilizados padrões de pI 3 a 10 Broad (GE Healthcare), cujas proteínas são amiloglicosidase (3,50), inibidor de tripsina de soja (4,55), β -lactoglobulina A (5,20), anidrase carbônica B bovina (5,85), anidrase carbônica B humana (6,55), mioglobina ácida de cavalo (6,85), mioglobina básica de cavalo (7,35), lectina ácida de lentilha (8,15), lectina intermediária de lentilha (8,45), lectina básica de lentilha (8,65) e tripsinogênio (9,30). As duas amostras foram aplicadas no gel, com o pente de aplicação de 4 μ L para 6 amostras. A corrida eletroforética foi realizada no equipamento PhastSystem® com corrente constante de 2.5 mA, voltagem de 2.000 V e duração de 30 minutos. A revelação do gel foi feita com solução aquosa do corante de Coomassie Brilliant Blue R350 (PhastGel Blue R, GE Healthcare) 0,1% em metanol 30% e ácido acético 10%. Após 1 hora de incubação com o corante à temperatura ambiente, o gel foi descorado por meio de lavagens sucessivas com solução aquosa de metanol 30% e ácido acético 10%. Em seguida, o gel foi digitalizado no aparelho Gel DOC XR+™ (Bio-Rad) e a densitometria das bandas

eletroforéticas foi realizada no programa Image Lab™ (Bio-Rad). Os valores de pI foram estimados contra a curva de calibração: $Y = -0.44 * x + 0.98$, $R^2 = 0.969091$.

4.29. Avaliação da atividade glutaminásica

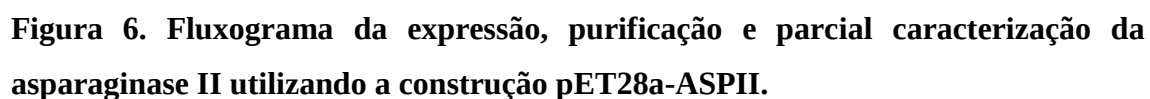
Esses ensaios foram realizados conforme descrito por Pinheiro (2015), com o objetivo de analisar a atividade enzimática da asparaginase II recombinante expressa em *E. coli* utilizando como substrato L-glutamina 5 g/L. Os ensaios foram conduzidos conforme descrito no item 4.23, substituindo a L-asparagina por L-glutamina.

4.30. Ensaios de atividade antitumoral in vitro por MTT

As células K562 (linhagem celular de leucemia mieloide aguda) e Jurkat (linhagem de leucemia de célula T humana) foram cultivadas em meio de cultura RPMI1640 suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 0,1 mg/mL e gentamicina 0,05 mg/mL e mantidas em fase exponencial de crescimento. Vinte e quatro horas antes do ensaio, 5×10^4 células/mL foram adicionadas aos poços de placas de 96 poços e mantidas a 5% de CO₂ e 37°C. O tratamento com a amostra de asparaginase purificada foi realizado em um ensaio dose-resposta (de 0,312 a 5 IU mL⁻¹), cada concentração foi realizada em triplicata. Tampão fosfato de sódio 20 mM, estaurosporina 1 mM e asparaginase comercial (medicamento Aginasa, Bagó, Lote E120234A) foram utilizados como controles para a inibição do crescimento celular. Após 48 horas de incubação, adicionou-se azul de tiazolilo (MTT) 2,5 mg/mL e manteve-se a placa numa incubadora de CO₂ durante 4 horas. Os cristais de formazan gerados pela atividade celular foram solubilizados com álcool isopropílico e a absorbância a 570 nm foi determinada usando um leitor de microplacas (VictorX5; Perkin Elmer, EUA).

Para o cálculo de viabilidade celular, seguimos a fórmula: Viabilidade (%) = (Do da amostra/Do controle) x 100%. O IC₅₀ foi calculado utilizando o software Graph Pad Prism (Versão 5.01).

Foram desenhados fluxogramas para o maior entendimento dos experimentos realizados com as construções pET28a-ASPII (Figura 6) E pET22b-ASPII (Figura 7).



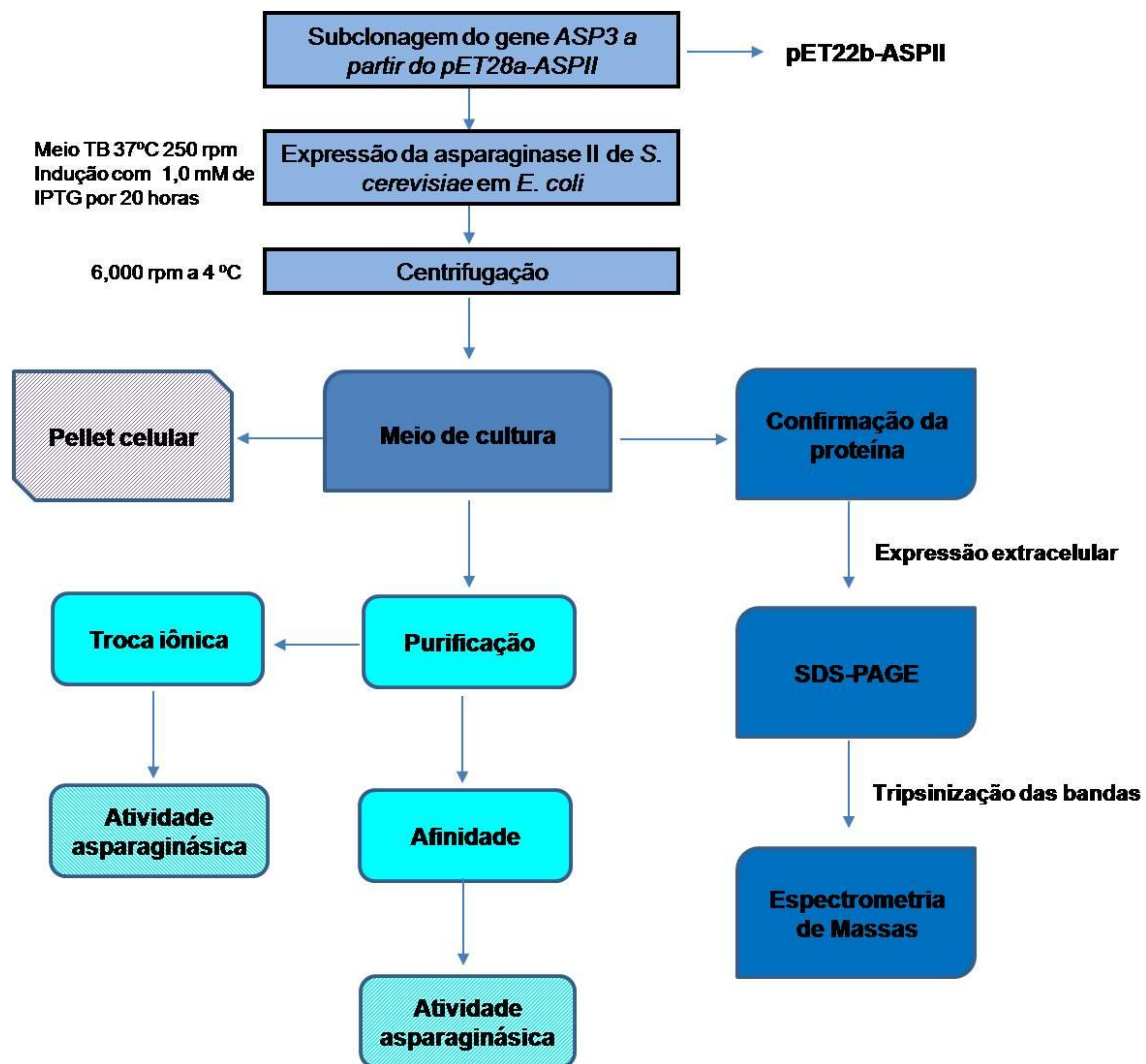


Figura 7. Fluxograma da expressão, confirmação da proteína e purificação da asparaginase II utilizando a construção pET22b-ASPII.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Amplificação e clonagem do gene *ASP3*

Com o intuito de obter a mesma sequência de aminoácidos da asparaginase II de *S. cerevisiae* clonada em *P. pastoris* (Ferrara *et al.*, 2006), no presente trabalho foi amplificada a região do gene *ASP3* correspondente aos aminoácidos 33 a 362 da proteína, retirando-se, portanto, a sequência sinal (25 aminoácidos) mais 7 aminoácidos em seu N-terminal.

O fragmento do gene *ASP3* foi amplificado com sucesso do DNA genômico isolado de *S. cerevisiae* (S288c) por PCR. A eletroforese revelou a amplificação de um único fragmento de aproximadamente 990 pb, conforme o tamanho esperado (Figura 8). O gene clonado foi sequenciado por método automático e realizada a análise no software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; website: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), apresentando alta similaridade com vários genes *ASP3* de *S. cerevisiae* (S288c). Tais genes estão depositados no banco de dados do NCBI, incluindo a sequência que foi utilizada para o desenho dos primers (*GenBank*: BK006945.2), os quais apresentaram 98% de identidade. A partir da sequência de aminoácidos estimada pelo programa pDRAW32 (*AcaClone Software*) e utilizando a sequência de nucleotídeos do gene clonado, pode ser feita a análise de similaridades das sequências de aminoácidos depositados no banco de dados do BLAST com a proteína estudada. A busca resultou na asparaginase de *S. cerevisiae* (S288c) com 100% de identidade depositada com o número de acesso NP_013256.1.

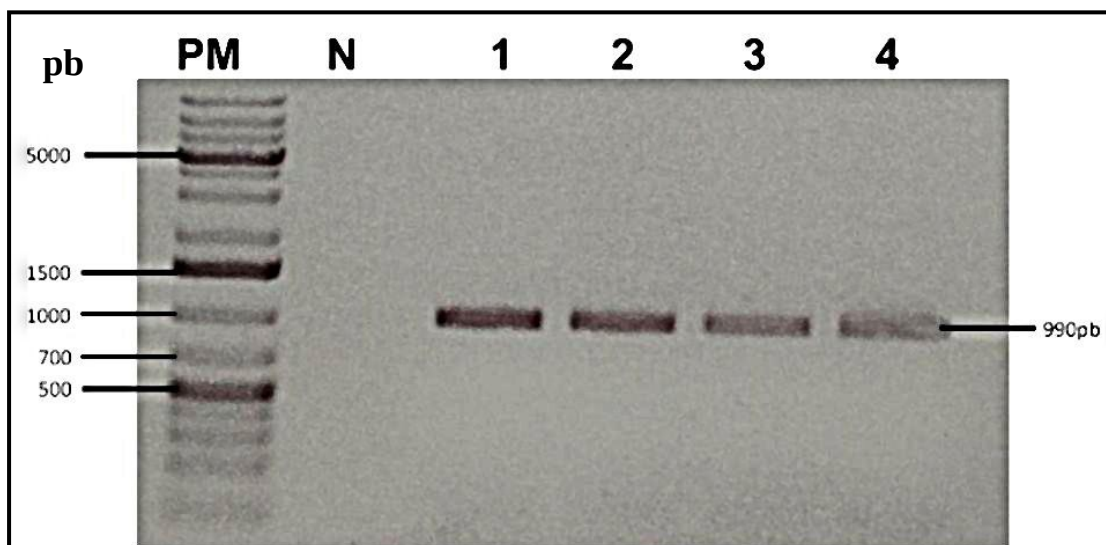


Figura 8. Amplificação do gene *ASP3* de *S. cerevisiae* pela técnica da PCR. Gel de agarose a 1,5%; PM - GeneRuler 1kb Plus (Thermo Scientific); N – Controle negativo (sem DNA genômico); 1 e 2 – Bandas referentes ao gene *ASP3* amplificado a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae* sem diluição; 3 e 4 - Bandas referentes ao gene *ASP3* amplificado a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae* diluído 1:10.

O fragmento de DNA foi purificado a partir do gel de agarose e digerido pelas enzimas *NdeI* e *XhoI*, conforme descrito em Material e Métodos. O fragmento digerido foi clonado diretamente no vetor pET-28a digerido com as mesmas enzimas. Utilizando esse vetor, espera-se a expressão da proteína de forma solúvel no interior da célula, podendo ocorrer, entretanto, a formação de corpúsculo de inclusão. O plasmídeo foi nomeado como pET28a-ASPII (devido ao nome da proteína asparaginase II expressa pelo gene *ASP3* de *S. cerevisiae*). Com o objetivo de confirmar a ligação do gene *ASP3* ao vetor pET28a, o plasmídeo recombinante foi inserido em células de *E. coli* DH5 α para a amplificação clonal. Após o crescimento celular, foram selecionados alguns clones para análise de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para clonagem do gene ao vetor pET28a. Espera-se que pela utilização dessas enzimas sejam gerados dois fragmentos, correspondendo ao tamanho do gene *ASP3* (990 pb) e do vetor pET28a (5389 pb). Na Figura 9 é possível visualizar a confirmação da ligação do gene ao vetor em apenas um clone de *E. coli* DH5 α transformado com o plasmídeo pET28a-ASPII.

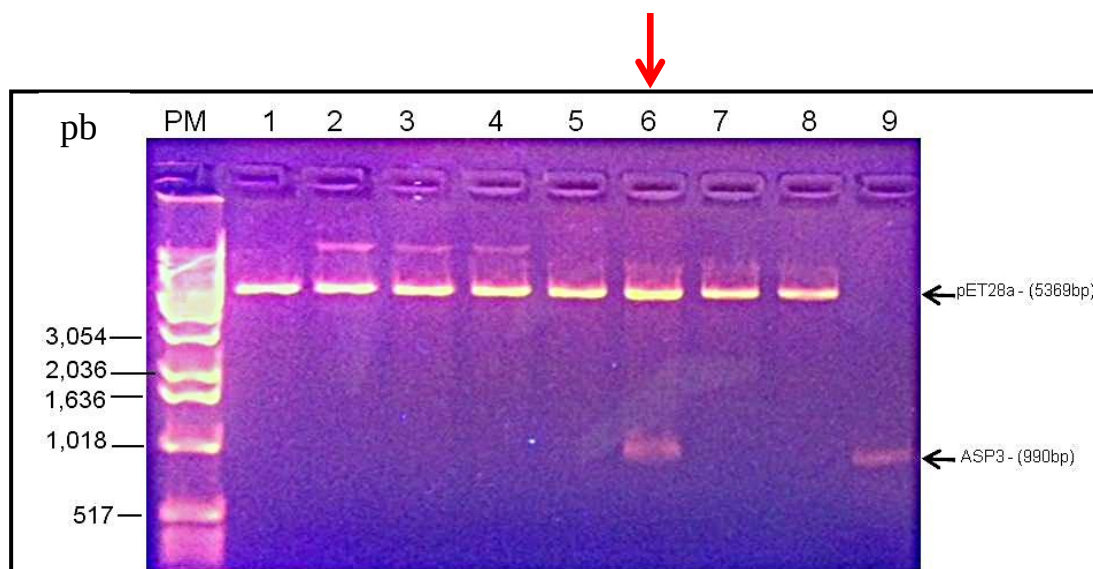


Figura 9. Seleção de clones (*E. coli* - DH5 α) transformados com pET28a-ASPII. Análise por restrição (*NdeI* e *XhoI*). Gel de agarose a 1,5%; PM – Peso Molecular 1Kb (*Invitrogen*); **1 a 8** – clones transformados com pET-28a -ASP3; **9** – controle positivo do gene *ASP3* (PCR). Observa-se apenas o clone 6 como positivo.

O clone positivo foi cultivado para amplificar o número de cópias do plasmídeo. Estes, após extração e purificação, foram empregados para transformar a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) e expressar a proteína recombinante.

Foram selecionados alguns clones, porém em apenas dois observou-se a expressão intracelular de uma proteína de aproximadamente 38 kDa, valor próximo ao esperado para a asparaginase recombinante, conforme dedução teórica utilizando o programa ProtParam (cerca de 37 kDa). A seleção dos clones positivos, nos quais se observou a expressão de proteína recombinante pela indução por IPTG, pode ser visualizada na Figura 10. A visualização da expressão da proteína recombinante revela o sucesso da construção do plasmídeo.

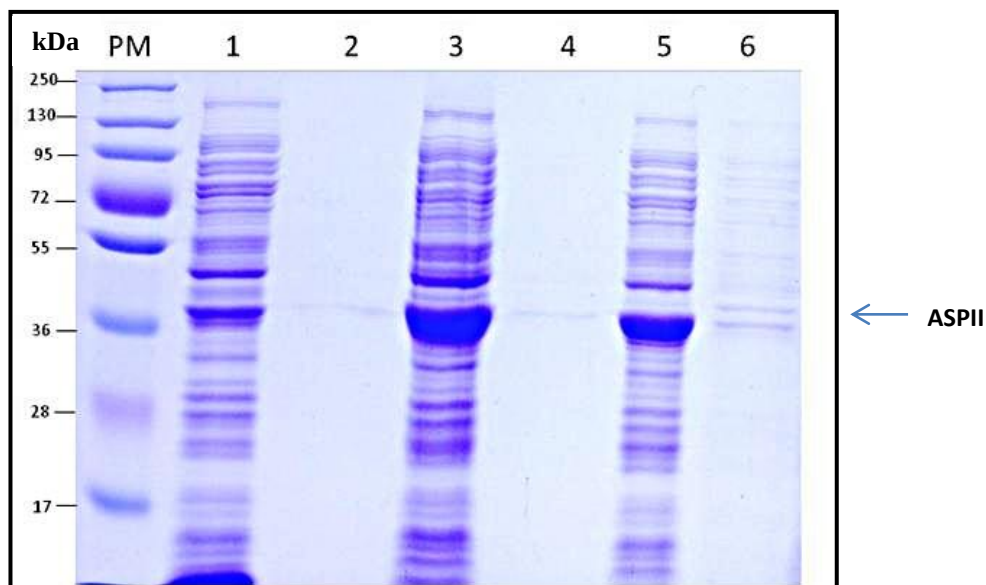


Figura 10. Seleção de clones (*E. coli* - BL21 DE3) transformados com pET28a-ASPII através da indução com IPTG 1 mM para expressão da asparaginase a 37°C por 3 horas de indução. Gel de SDS-PAGE a 12%. PM – Peso Molecular *Page Ruler Plus* (Thermo Scientific #26619). 1 – pET28a-vazio (extrato total); 2 – pET-28a-vazio (Sobrenadante da cultura); 3 – Clone 1 (extrato total); 4 – clone 1 (meio de cultura); 5 – Clone 2 (extrato total); 6 – clone 2 (meio de cultura). A asparaginase pode ser observada próximo ao peso molecular de 36 kDa, como indicado com uma seta na figura.

5.2. Subclonagem do gene *ASP3* para expressão extracelular da asparaginase II utilizando o vetor pET22b

A clonagem no vetor pET22b facilita a expressão da proteína para o espaço periplasmático, de onde poderá ser secretada para o meio de cultivo através de transporte passivo ou extravasamento da proteína pelo rompimento da célula, conforme ocorreu com a expressão da L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *E. coli*

(Einsfeldt, 2014). Após a clonagem do gene *ASP3* no vetor pET22b, foi gerado o plasmídeo pET22b-ASPII. Essa construção foi usada para transformar células DH5 α para aumentar o número de cópias do plasmídeo. Após a transformação, sete clones foram selecionados e analisados por PCR para avaliação da presença do gene *ASP3* (figura 11). Observa-se que quatro clones apresentaram o fragmento de 990 pb correspondente ao inserto.

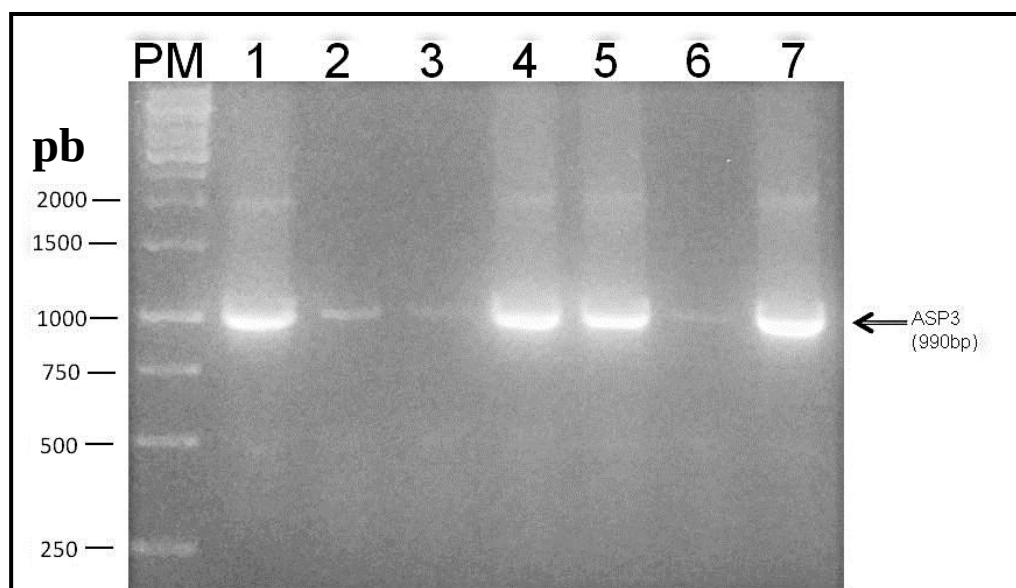


Figura 11. Seleção de clones (*E. coli* - DH5 α) transformados com pET22b-ASPII a partir da PCR. Gel de agarose a 1,5% PM – GeneRuler 1kb Plus (Thermo Scientific); 1 até 7 – clones transformados com pET22b-ASPII identificados pela presença do gene *ASP3*.

Os plasmídeos dos clones positivos (1, 4, 5 e 7, figura 11) foram purificados por Miniprep, conforme descrito em Materiais e Métodos. Após a extração plasmidial, foi realizada a análise de restrição com as enzimas *NcoI* e *XhoI* para confirmação da ligação do inserto ao vetor pET22b. Na Figura 12 pode ser observada a clivagem dos plasmídeos com êxito, mostrando que o fragmento do gene *ASP3* (990 pb) realmente se ligou ao vetor.

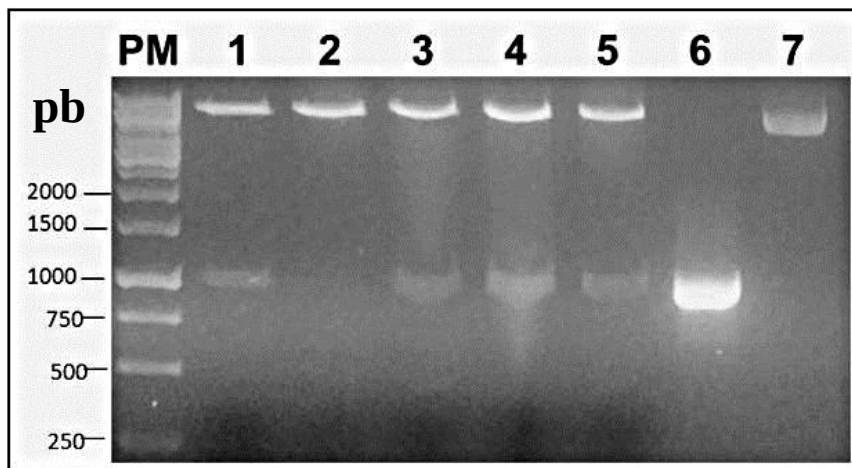


Figura 12. Seleção de clones (*E. coli* - DH5α) transformados com pET22b-ASP^{II}. Análise por restrição (*Nco*I e *Xho*I). Gel de agarose a 1,5% PM – GeneRuler 1kb Plus (Thermo Scientific); **1 até 5** – clones transformados com pET22b-ASP^{II}; **6** – controle positivo do gene ASP3 (PCR); **7** – Vetor pET22b vazio. Observam-se os clones 1, 3, 4 e 5 como positivos.

O plasmídeo pET22b-ASP^{II} positivo foi utilizado para transformar *E. coli* BL21 DE3 por eletroporação. Foram selecionados nove clones e a confirmação da presença do plasmídeo e do gene ASP3 foi realizada pela análise por PCR, sendo constatada a presença do gene ASP3 em oito dos clones selecionados (Figura 13).

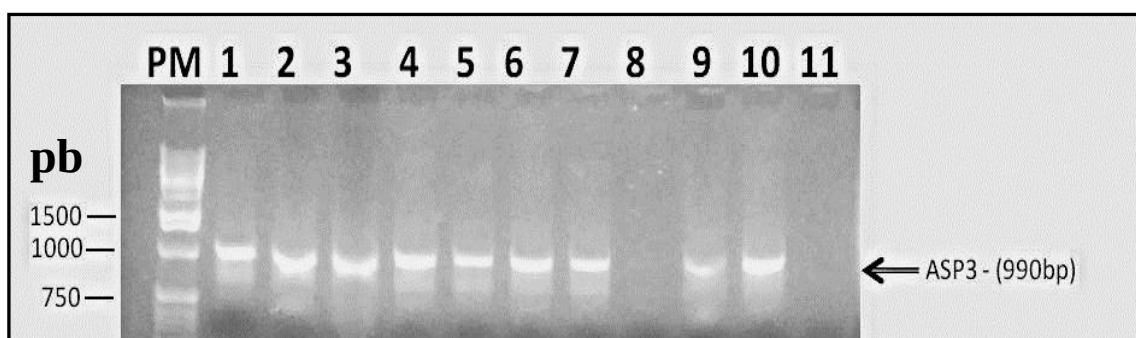


Figura 13. Amplificação do gene ASP3 nos clones (*E. coli* BL21 DE3) transformados com pET22b-ASP^{II} por PCR. Gel de agarose a 1,5% PM – GeneRuler 1kb Plus (Thermo Scientific); **1 até 9** – clones *E. coli* BL21 (DE3) transformados com pET22b-ASP^{II}; **10** – controle positivo pET28a-ASP3 (diluído 1:10); **11**- Controle negativo (foi adicionado água no lugar de DNA). Observa-se o clone **8** como negativo e os demais positivos comparados com o controle: (**10**).

Todos os clones positivos foram avaliados quanto à produção da proteína recombinante por indução por IPTG, sendo analisados apenas os sobrenadantes dessas culturas por SDS-PAGE, no intuito de avaliar a expressão extracelular da proteína recombinante (Figura 14). Todos os clones expressaram uma proteína com o tamanho esperado do monômero da asparaginase de aproximadamente 38 kDa. Portanto, a clonagem do gene *ASP3* em *E. coli* utilizando o vetor pET22b promoveu a expressão da asparaginase II de *S. cerevisiae* para o meio extracelular.

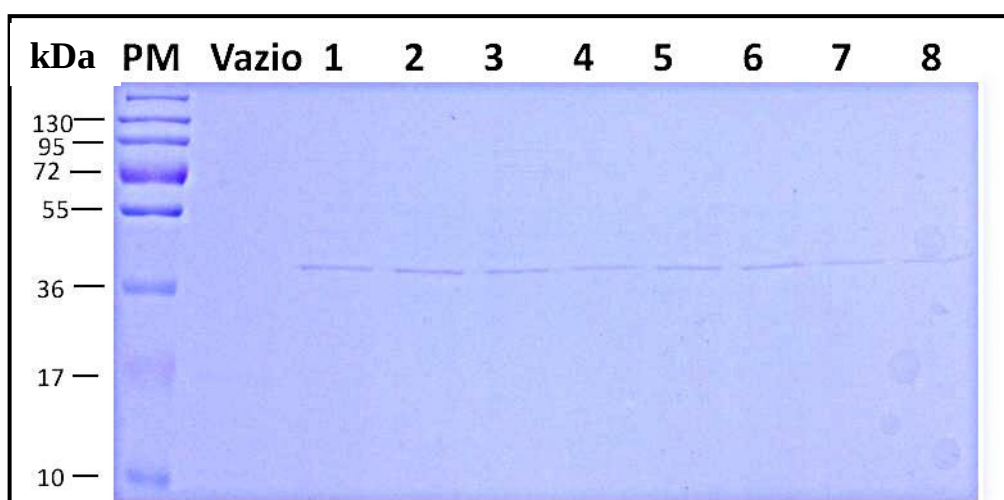


Figura 14. Seleção de clones (*E. coli* BL21-DE3) transformados com pET22b-ASPII através da indução com IPTG 1 mM a 37°C por 3 horas. Gel de SDS-PAGE a 12% em condições desnaturantes. Meio de cultura em meio LB após indução. PM – Peso Molecular Page Ruler Plus – 26619 (*Thermo Scientific*); Vazio – pET22b-vazio; Clones 1 até 8 (o clone 8 é o clone 9 identificado na figura 13) transformados com pET22b-ASPII.

5.3. Expressão da asparaginase II em frascos agitados utilizando os clones *E. coli* pET28a-ASPII e *E. coli* pET22b-ASPII e análise por Espectrometria de Massas para identificação da asparaginase de *S. cerevisiae*

A expressão da proteína utilizando a construção *E. coli* BL21 DE3/pET28a-ASPII foi realizada através da indução com IPTG 0,1 mM a 15°C por 20 horas. Essas condições favoreceram a expressão intracelular da proteína recombinante de forma solúvel, porém também houve a formação de corpúsculo de inclusão e não foi observada significativa expressão no meio de cultura (Figura 15). Ressalta-se que as

bactérias nem sempre são capazes de expressar na conformação correta proteínas nativas excretadas de eucariotos, resultando na formação de corpúsculos de inclusão. Isso ocorre porque os sistemas procariotos não realizam modificações pós-traducionais, que são muitas vezes cruciais para garantir a conformação estrutural correta da molécula e, por conseguinte, sua atividade biológica (Sahdev *et al.*, 2008; Upadhyay *et al.*, 2014; Saeed *et al.*, 2018). De fato, Santos e colaboradores (2016) testaram 93 estratégias, incluindo diferentes combinações de linhagens hospedeiras, vetores, regiões codificadoras do gene (correspondentes aos aminoácidos 1 a 362; 26 a 362; e 32 a 362) e condições de cultivo, entre outras, para a clonagem do gene *ASP3* em *E. coli*, nenhuma delas coincidente com a utilizada no presente trabalho. Em todas as estratégias, a proteína foi obtida de forma insolúvel e sem atividade, com exceção de uma (pET15b com a inserção do gene *ASP3* – correspondente aos aminoácidos 32 a 362), que resultou em uma pequena quantidade de proteína solúvel com baixa atividade específica após purificação (Santos *et al.*, 2016). Porém, no presente trabalho pode ser observada a expressão de forma solúvel, após a lise celular, (Figura 15, canaleta 4). Esse resultado é muito importante, porque a expressão solúvel facilita a recuperação da proteína através da purificação por IMAC, com o auxílio da cauda de histidina, sem a necessidade de realizar a etapa de reenovelamento, como é o caso da proteína presente no corpúsculo de inclusão.

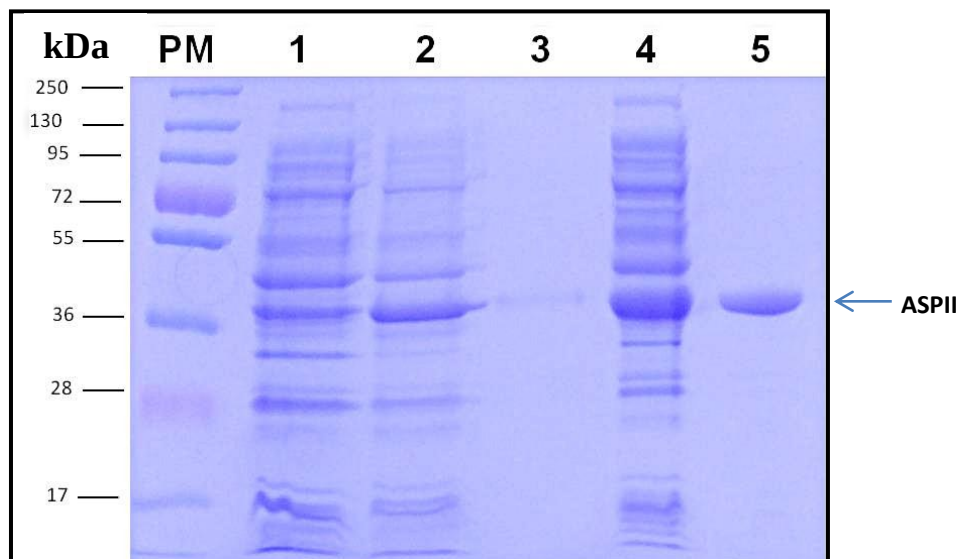


Figura 15. Expressão solúvel e formação de corpúsculo de inclusão utilizando o plasmídeo pET28a-ASPII em *E. coli* BL21 (DE3) com indução por IPTG 0,1 mM a 15°C por 20 horas. Gel de SDS-PAGE a 12% em condições desnaturantes; PM – Peso Molecular Page Ruler Plus – 26619 (*Thermo Scientific*) 1 – Extrato celular sem indução por IPTG; 2 – Extrato celular após indução com IPTG 0,1 mM; 3 – Meio de cultura concentrado 10X com Centriprep (*Millipore*); 4 – Fração solúvel; 5 – Corpúsculo de inclusão (CI).

A expressão solúvel da asparaginase II em *E. coli* pode ter sido influenciada pela adição de glicose no meio de cultura, pois a alta concentração desse açúcar resulta em repressão catabólica, diminuindo a captação de lactose e elevando a adenosina monofosfato cíclica (AMPC). Esses fatores ocasionam a redução de afinidade da RNA polimerase, levando à diminuição da expressão dos genes associados ao operon *lac* (Deutscher *et al.*, 2006). Tais fatores associados ao crescimento microbiano em temperaturas mais baixas diminuem a taxa de replicação de *E. coli*, geralmente promovendo a expressão de proteínas solúveis (Schein *et al.*, 1988).

O crescimento bacteriano em temperaturas mais baixas é uma técnica bem conhecida para facilitar o enovelamento correto. A razão pela qual a temperatura mais baixa favorece o estado nativo da proteína expressa está relacionada a uma série de fatores, incluindo a diminuição na força motriz para a associação de proteínas; taxa mais lenta de síntese proteica; mudanças na cinética de enovelamento da cadeia polipeptídica etc. Um sistema de expressão especificamente induzido à baixa temperatura e em conjunto com as chaperonas moleculares pode produzir um sistema novo e poderoso para obter proteínas solúveis (Schumann & Ferreira, 2004).

As chaperonas moleculares são proteínas altamente conservadas que ajudam outros polipeptídeos a alcançar sua conformação nativa sem se tornarem parte da estrutura final. Elas não são catalisadores de dobramento, uma vez que não aceleram as taxas de enovelamento. Em vez disso, elas impedem reações de agregação fora da via por domínios hidrofóbicos de ligação em polipeptídeos parcialmente dobrados ou não-dobrados designados como proteínas não-nativas (Schumann & Ferreira, 2004). As chaperonas moleculares são divididas em enoveladoras e de suporte estrutural. Ambas as classes interagem com cadeias polipeptídicas não nativas através de superfícies hidrofóbicas expostas. Enquanto as chaperonas enoveladoras medeiam seu reenovelamento em um processo dependente de ATP, as chaperonas de suporte ligam proteínas não-nativas e impedem sua agregação (Schumann & Ferreira, 2004).

A concentração do indutor também desempenha um papel importante na expressão solúvel de proteínas recombinantes (Antoniou *et al.*, 2017). A estratégia baseada em baixa temperatura, concentração de indutor, variação no tempo de indução do gene alvo e expressão de chaperona foi usada para reduzir a agregação de xilanase em *E. coli* e aumentar sua expressão solúvel e com atividade enzimática (Jhamb & Sahoo, 2012).

Para a expressão utilizando a construção pET22b-ASP^{II}, para a qual é esperada expressão extracelular, a cultura em frascos agitados foi induzida por IPTG 1mM a

37°C por 20 horas. Observa-se para o sobrenadante da cultura uma banda proteica predominante, de cerca de 38 kDa, indicando a expressão extracelular da asparaginase (Figura 16). Não foi observada a formação de corpúsculo de inclusão como ocorreu para a construção pET28a-ASPII.

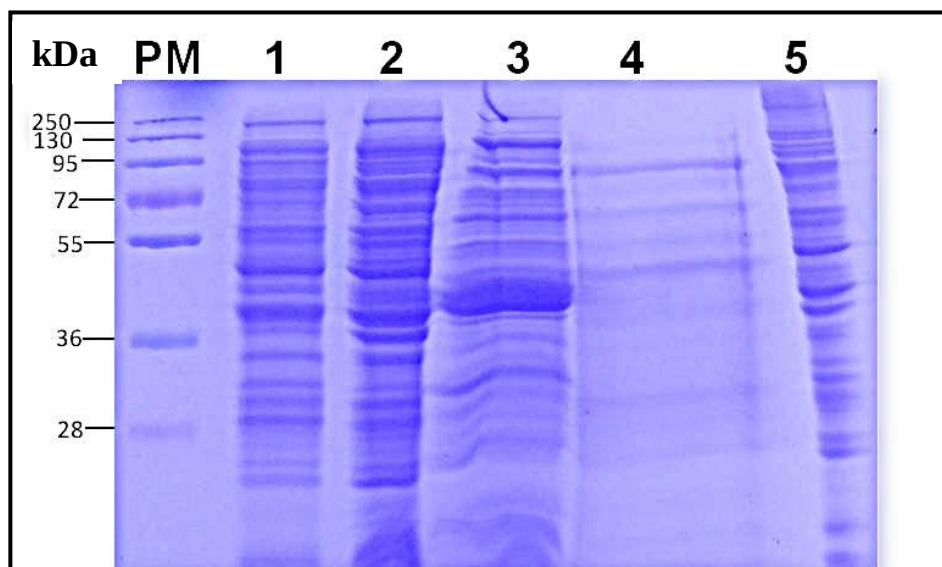


Figura 16. Expressão solúvel utilizando o plasmídeo pET22b-ASPII em *E. coli* com indução por IPTG 1 mM a 37°C por 20 horas. Gel de SDS-PAGE a 12%; PM – Peso Molecular *Page Ruler Plus* – 26619 (*Thermo Scientific*) 1 – pellet celular sem indução por IPTG; 2 – Extrato celular após indução com IPTG; 3 – meio de cultura concentrado 10X com Centriprep (Millipore); 4 – Fração solúvel; 5 – Corpúsculo de inclusão.

Proteínas secretadas podem extravasar do espaço periplasmático para o meio de cultura, possivelmente devido ao aumento da permeabilidade da membrana celular (Tong *et al.*, 2000). Essa observação tem forte apelo industrial, pois a expressão da proteína periplasmática ou potencialmente extracelular no meio de cultura facilita significativamente os processos de purificação, devido ao menor número de proteínas contaminantes presentes no meio extracelular em relação ao intracelular (Cornelis, 2000; Jones, 2002). Além disso, as L-asparaginases nativas bacterianas são expressas para o meio extracelular com auxílio de um peptídeo sinal que transporta a proteína para o periplasma da célula (Kotzia & Labrou, 2005). De forma semelhante, já foi observado que a asparaginase de *Erwinia carotovora* foi expressa tanto no periplasma da célula como secretada no meio de cultura utilizando *E. coli* como plataforma de expressão (Wink *et al.*, 2010). Karamitros & Labrou (2014) também descreveram a

expressão extracelular, para o meio de cultura, da L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* utilizando *E. coli*.

As construções do presente trabalho foram comparadas quanto à expressão da asparaginase em termos de atividade enzimática de cada etapa (sobrenadante da cultura, extrato celular, fração solúvel e corpúsculo de inclusão) com o objetivo de selecionar a construção com maior produção da proteína recombinante. Para isso, foram realizados cultivos em triplicata de cada construção (*E. coli* pET28a-ASPII e *E. coli* pET22b-ASPII) e também do controle negativo (pET28-vazio sem o gene *ASP3*).

A expressão da asparaginase recombinante, utilizando *E. coli* transformada com o plasmídeo pET28a-ASPII apresentou 225,6 UI/g de célula (atividade medida no pellet celular) (Figura 17). Este valor é cerca de duas vezes maior do que a atividade da asparaginase nativa de *S. cerevisiae* expressa por fermentação em frascos agitados, que apresentou 115 UI/g (Ferrara *et al.*, 2004). A expressão extracelular obtida para essa construção foi de 14,9 UI/g de célula. Após lise celular, a fração solúvel apresentou 192,9 UI/g de célula. Não foi detectada atividade enzimática no corpúsculo de inclusão.

O pellet celular da fermentação utilizando a construção pET22b-ASPII apresentou 155,4 UI/g, enquanto que a expressão extracelular foi de 54,1 UI/g. Após a lise celular, a fração solúvel apresentou 120,9 UI/g (Figura 17) e o corpúsculo de inclusão não apresentou atividade.

A atividade asparaginásica observada para a construção com o vetor vazio (sem o gene *ASP3*) foi muito inferior (24,1 UI/g) quando comparada com as obtidas com as construções contendo o gene *ASP3* (225,6 UI/g).

A atividade asparaginásica total por grama de célula (atividade extracelular somada à atividade no pellet) foi maior para a construção pET28a-ASPII (240,15 UI/g) do que para a construção pET22b-ASPII (209,5 UI/g). Diferenças de rendimento entre duas construções para produção de asparaginase foi evidenciada também por outros autores. Einsfeldt (2014) clonou o gene da L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *E. coli* utilizando o vetor pET26b, que possui o mesmo peptídeo sinal (*pelB*) do vetor pET22b; o cultivo da linhagem recombinante em biorreator com meio de cultura complexo após quatro horas da indução por IPTG resultou em 172,7 UI/g de célula, valor semelhante ao obtido no presente trabalho para a construção *E. coli* pET22b-ASPII. Por outro lado, a atividade enzimática da asparaginase II recombinante expressa de forma intracelular (citossólica) de *E. coli* MTCC 739 apresentou maior atividade comparada com a proteína coletada do periplasma (Vidya *et al.*, 2011). Da mesma

forma, neste trabalho, a construção (pET28a-ASP^{II}) que expressou a proteína intracelular apresentou maior atividade comparada à extracelular.

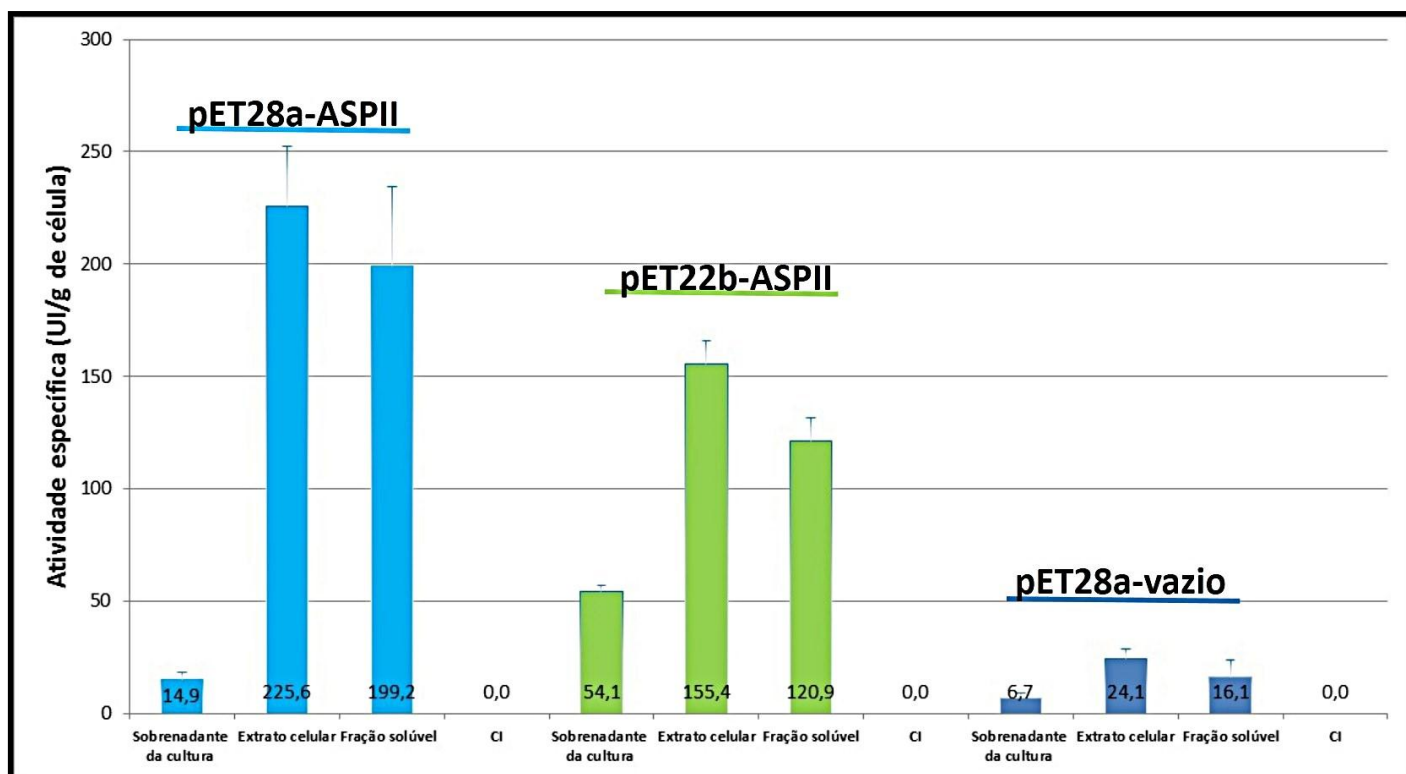


Figura 17. Atividade asparaginásica específica (UI/g de célula) das diversas frações do cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com pET-28a-ASP^{II}, pET-22b-ASP^{II} e pET-28a-vazio (sem o gene *ASP3*). CI (corpúsculo de inclusão). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e lisados utilizando por prensa francesa.

5.4. Identificação asparaginase recombinante por espectrometria de massas

A proteína expressa pela construção *E. coli* pET28a-ASP3 foi analisada por espectrometria de massas para confirmar a identidade com a asparaginase II de *S. cerevisiae*. Para isto, as bandas de aproximadamente 38 kDa correspondentes às frações solúveis e corpúsculo de inclusão foram excisadas, como demonstrado na Figura 18, e tripsinizadas. Os resultados obtidos de MS/MS foram analisados com o auxílio do programa Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) e a busca das proteínas na base de dados do Blast. Os dados da Tabela 1 indicam que a

asparaginase II de *S. cerevisiae* foi observada nas bandas 1 e 2, confirmando a expressão dessa proteína em *E. coli*.

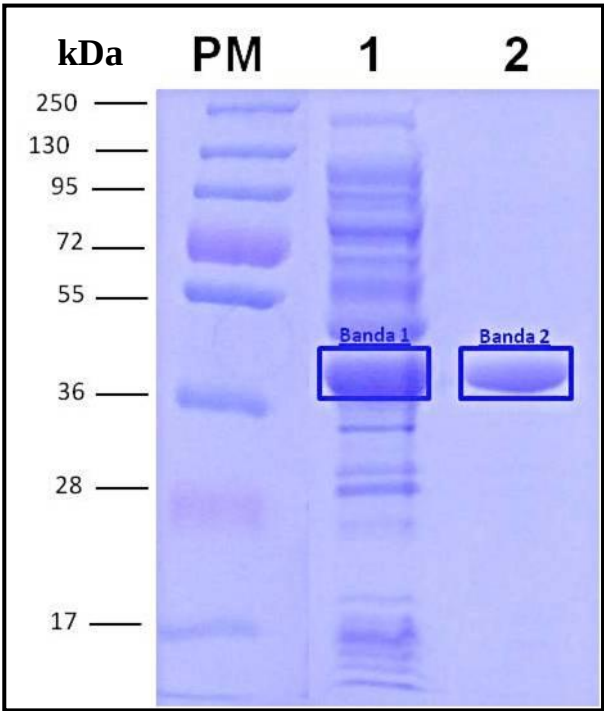


Figura 18. Bandas excisadas do gel para tripsinização e identificação por espectrometria de massas da asparaginase II de *S. cerevisiae* a partir da expressão em *E. coli* BL21 (DE3) pET28a-ASPII. Gel de SDS-PAGE a 12%; **PM** – Peso Molecular *Page Ruler Plus* (*Thermo Scientific*); **1** – Sobrenadante após lise celular; **2** – Corpúsculo de inclusão (CI).

Tabela 1. Identificação dos peptídeos obtidos pela expressão realizada por *E. coli* BL21 (DE3) pET28a-ASPII. Resultados gerados pela base de dados Mascot, correspondendo aos resultados de MS/MS.

Proteína	Microrganismo	Score	Matches	Peptídeos	Banda	Nº de acesso
ASP	<i>S. cerevisiae</i> S288c	354	5 (3)	R.IASGFWTTK.M	1	NP_013256
				R.ILLQLCLYSGYGMDQIR.S	2	
				R.RTADGTVPPDDAPEYAIGSGYLNPK.S	1,2	
				K.GIVLAGSGAGSWTATGSIVNEQLYEEYGIPVHSR.R	2	

O mesmo procedimento foi realizado para a proteína expressa pela construção pET22b-ASPII, observada em gel de SDS-PAGE (figura 16). Na Tabela 2 estão descritos os peptídeos que conferem identidade com a asparaginase II de *S. cerevisiae*. A identificação dos peptídeos referentes à asparaginase confirma a expressão da asparaginase recombinante para o meio extracelular em *E. coli*. No entanto, o score (118) para essa proteína solúvel foi menor do que o verificado para a proteína expressa de forma intracelular utilizando pET28a-ASPII, de 354. Isso pode ser visualizado pela quantidade de peptídeos encontrados, sendo maior para a construção pET28a-ASPII.

Tabela 2. Identificação dos peptídeos das bandas do gel da expressão realizada em *E. coli* BL21 (DE3) pE22b-ASPII. Resultados gerados pela base de dados Mascot, correspondendo aos resultados de MS/MS.

Proteína	Microrganismo	Score	Matches	Peptídeos	Banda	Nº de acesso
ASP	<i>S. cerevisiae</i> S288c	118	2 (1)	R.IASGFWTK.M R.RTADGTVPPDDAPEYAIGSGYLNPK.S	3	NP_013256

5.5. Purificação da asparaginase extracelular expressa por *E. coli* pET22B-ASPII

A expressão da asparaginase por *E. coli* pET22b-ASPII produz uma proteína ligada à cauda de histidina (devido à sequência codificadora dessa sequência de aminoácidos presente no vetor pET22b), que possibilita a purificação por afinidade ao níquel. Assim, foi testada a utilização de uma coluna HisTrap HP (GE) de 5 mL para purificação da asparaginase extracelular (excretada para o meio de cultura) obtida através desta construção. Observou-se que a proteína foi eluída por completo, indicando a não eficiência desta estratégia de purificação (Figura 19). Este resultado sugere que a cauda de histidina não estaria exposta após o enovelamento da proteína, impedindo a sua ligação à coluna. Não foi detectada atividade enzimática para a amostra eluída.

Para verificar a presença da cauda de histidina, a proteína foi previamente desnaturada por adição de uréia 4 M e, em seguida, aplicada na coluna HisTrap. Pode ser observado que a proteína desnaturada ligou-se à resina, confirmando a presença da cauda de histidina (Figura 20). Devido à desnaturação, não foi evidenciada atividade enzimática.

Como alternativa à purificação da asparaginase, foi utilizada a coluna de troca iônica Capto-Q (GE). Neste caso, foi possível recuperar a proteína presente no meio de cultura (Figura 19). No entanto, também não se observou atividade da proteína após a análise enzimática das frações que foram utilizadas para carregar o gel de SDS-PAGE (cromatograma não mostrado), canaletas 3, 4, 5 e 6. Foi observado também que a proteína expressa no meio extracelular com a construção pET22b-ASPII possuía atividade de 1,301 UI/mL, porém perdeu a atividade após a etapa de troca de tampão para retirada do meio de cultura e posterior purificação. A perda da atividade ocorreu até mesmo quando o meio de cultura, sem prévia mudança de tampão, foi utilizado diretamente na purificação.

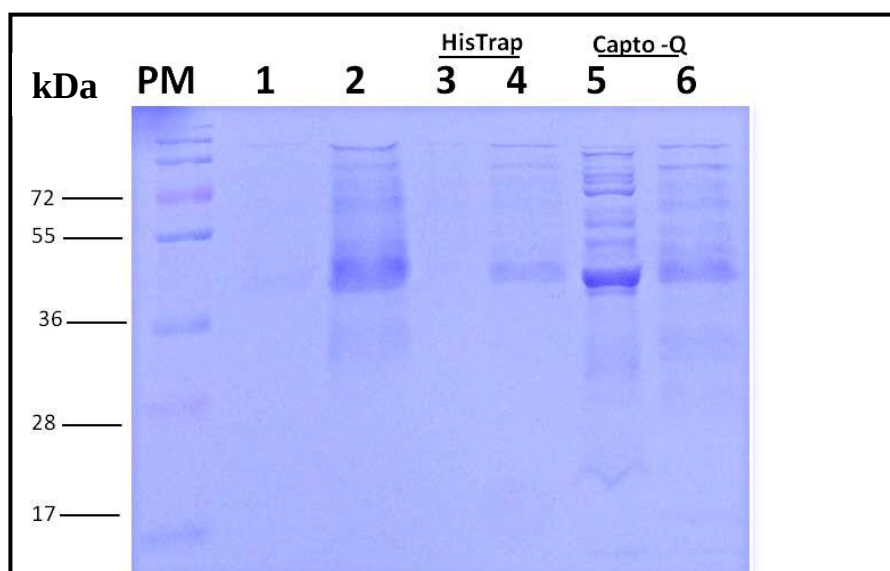


Figura 19. Purificação por afinidade e por troca iônica da asparaginase extracelular expressa utilizando *E. coli* pET22b-ASPII com o equipamento AKTA Avant 25 (GE). Gel de SDS-PAGE a 12%; PM – Peso Molecular Page Ruler Plus (*Thermo Scientific*) 1 – *Input* da amostra solúvel sem concentrar; 2 – *Input* da amostra solúvel concentrada 5 X; 3 – Fração (**pool**) purificada com HisTrap com gradiente linear de Imidazol; 4 – *Flow Through* (FT) da coluna HisTrap (fração não retida na coluna). 5 – Fração purificada (*pool*) com troca iônica (Capto Q); 6 – FT da coluna Capto Q (fração não retida na coluna).

A perda da atividade utilizando a construção pET22b-ASP^{II} talvez tenha ocorrido durante o processamento da amostra, pois a asparaginase II expressa utilizando o vetor pET28a-ASP^{II} permaneceu com atividade, mesmo possuindo a cauda de histidina (descrição no item 5.8).

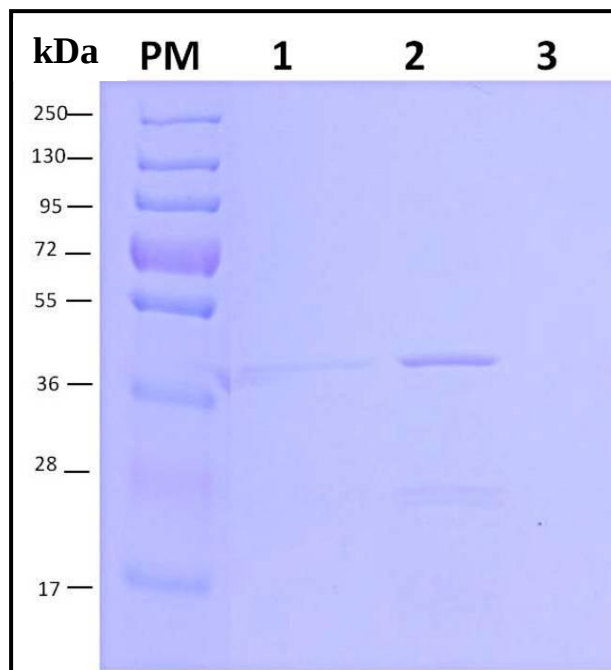


Figura 20. Purificação em condições desnaturantes (uréia 4 M) da asparaginase extracelular expressa utilizando *E. coli* pET22b-ASP^{II}. Gel de SDS-PAGE a 12%; PM – Peso Molecular *Page Ruler Plus* (Thermo Scientific); 1 – *Input* (meio de cultura com uréia 4M); 2 – fração purificada; 3 – *Flow Through* (fração não retida na coluna).

Alguns trabalhos demonstraram que a L-asparaginase II recombinante de *E. coli* foi expressa na forma extracelular, contendo também cauda de seis histidinas com auxílio do peptídeo sinal *pelB*, o mesmo utilizado no presente trabalho. Essa proteína recombinante foi purificada, com atividade, a partir do sobrenadante da cultura com uma única etapa de purificação, utilizando cromatografia de afinidade ao níquel (Khushoo *et al.*, 2004). Por outro lado, a proteína recombinante de *E. chrysanthemi* secretada em *E. coli* foi purificada diretamente do meio de cultura, simplificando consideravelmente os processos de *downstream* (Karamitros & Labrou, 2014). No entanto, o autor não descreveu a atividade da proteína após essa etapa de purificação, não sendo possível, portanto, comparar com o esse estudo.

Devido ao fato da proteína extracelular avaliada nesse trabalho não apresentar atividade após a etapa de purificação proposta, os esforços para purificação foram direcionados para a asparaginase expressa utilizando pET28a-ASP II.

5.6 Reenovelamento e purificação da asparaginase do corpúsculo de inclusão (CI) da expressão utilizando *E. coli* pET28A-ASP II

O corpúsculo de inclusão (CI; sem atividade enzimática), isolado a partir da fermentação da cepa de *E. coli* pET28a-ASP II, foi solubilizado com uréia 4 M e o reenovelamento da proteína foi conduzido na presença de arginina 0,1 M. Esse aminoácido auxilia na redução de agregados e promove a formação de tetrâmeros, conforme ocorreu com o reenovelamento da L-asparaginase de *E. coli* insolúvel (Upadhyay *et al.*, 2014). A asparaginase de *S. cerevisiae* reenovelada foi purificada utilizando a coluna de troca iônica Capto DEAE (GE) de 5 mL. A eluição foi realizada por gradiente de NaCl e analisada por SDS-PAGE (Figura 21 – Cromatograma não mostrado). No entanto, a proteína em gel desnaturante apresentou o tamanho de aproximadamente 76 kDa, que corresponde a duas vezes o tamanho esperado para a subunidade da asparaginase (38 kDa), sugerindo a formação de dímero. O mesmo comportamento foi observado para a asparaginase de *Pyrococcus furiosus* após a etapa de purificação (Bansal *et al.*, 2010). Mesmo com essa característica, a asparaginase recombinante de *S. cerevisiae* reenovelada do corpúsculo de inclusão (antes de iniciar a purificação) apresentou atividade de 0,164 UI/mL, correspondendo a 0,287 UI/mg de proteína. Com a confirmação da atividade, podemos concluir que houve o enovelamento da proteína utilizando essa metodologia, comparado ao corpúsculo de inclusão para o qual não se evidenciou atividade enzimática. Até o momento, não há relatos na literatura que evidenciem o reenovelamento da asparaginase recombinante de *S. cerevisiae*, a partir do CI, com atividade. Upadhyay e colaboradores (2014) descrevem que foi possível recuperar apenas 50% da atividade da asparaginase II recombinante de *E. coli*, apresentando 190 UI/mg, quando comparada à atividade da asparaginase comercial (200 UI/mg).

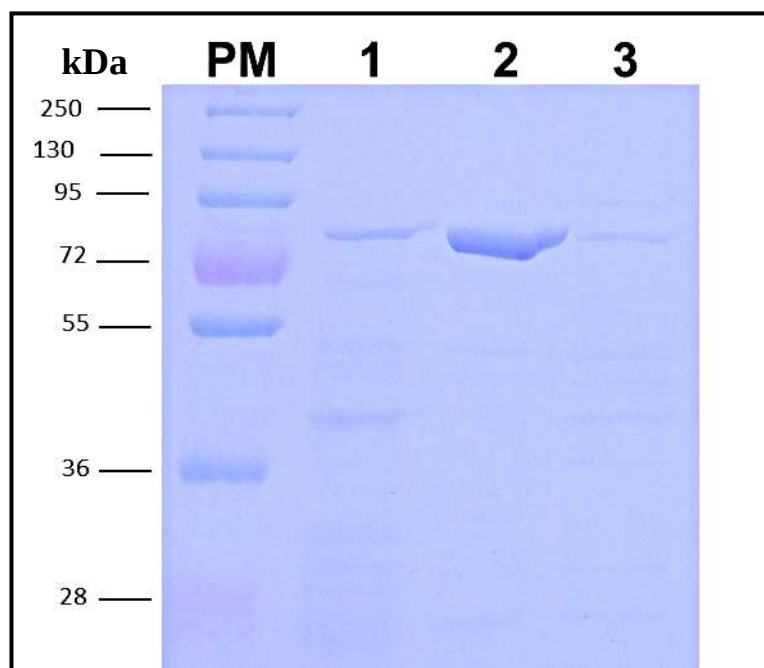


Figura 21. Purificação por troca iônica (Capto DEAE) da asparaginase reenovelada expressa em BL21 DE3 utilizando o plasmídeo pET28a-ASPII. Gel de SDS-PAGE a 12%; PM – Peso Molecular *Page Ruler Plus* (Thermo Scientific) 1 – *Input* (proteína utilizada para purificação) da proteína reenovelada; 2 – Fração eluída da asparaginase reenovelada; 3 – *Flow Through* (fração não retida na coluna).

5.7. Purificação por troca iônica da asparaginase da fração solúvel expressa por *E. coli* pET28a-ASPII.

A fração solúvel (sobrenadante após a lise celular) em tampão fosfato de sódio 0,02 M com manitol (0,550 mg/L) apresentou atividade de 0,876 UI/mL correspondendo a 3,10 UI/mg de proteína. Esse material foi utilizado para purificação por troca iônica utilizando uma coluna Capto Q (GE). A eluição foi realizada por gradiente de NaCl, conforme detalhado no cromatograma da purificação (Figura 22) e o material referente aos dois 2 picos coletados foram submetidos à eletroforese (Figura 23). O *pool* do pico 1 apresentou 8,16 UI/mL, porém com muitos contaminantes. Pode ser observado nessa figura uma amostra mais pura (canaleta 3) que apresentou atividade enzimática de 0,489 UI/mL (Figura 24), correspondendo a 0,859 UI/mg de proteína. Esse valor, embora superior ao observado para a amostra reenovelada do corpúsculo de inclusão, de 0,287 UI/mg de proteína, é considerado muito baixo, motivando o uso de outras estratégias de purificação visando a obtenção de uma recuperação maior da

asparaginase. Também foi observada a formação de dímeros na purificação da proteína solúvel, bem como presente no input da amostra.

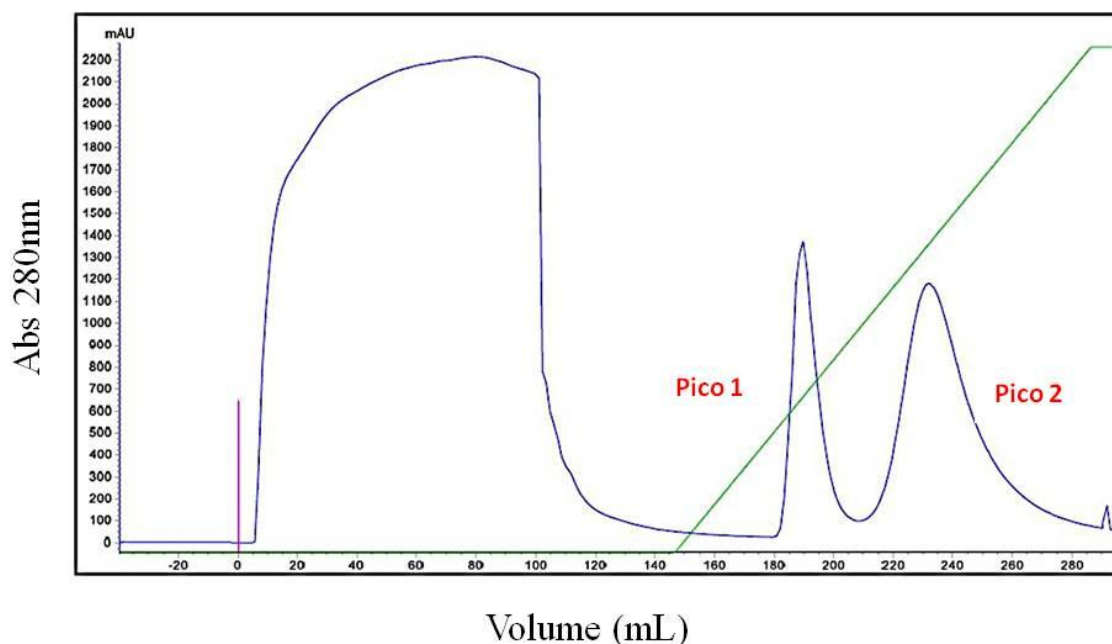


Figura 22. Cromatograma da purificação por troca iônica com gradiente de NaCl da asparaginase solúvel expressa por *E. coli* pET28a-ASPII utilizando a coluna Capto Q (GE). – Equipamento: AKTA Avant/GE

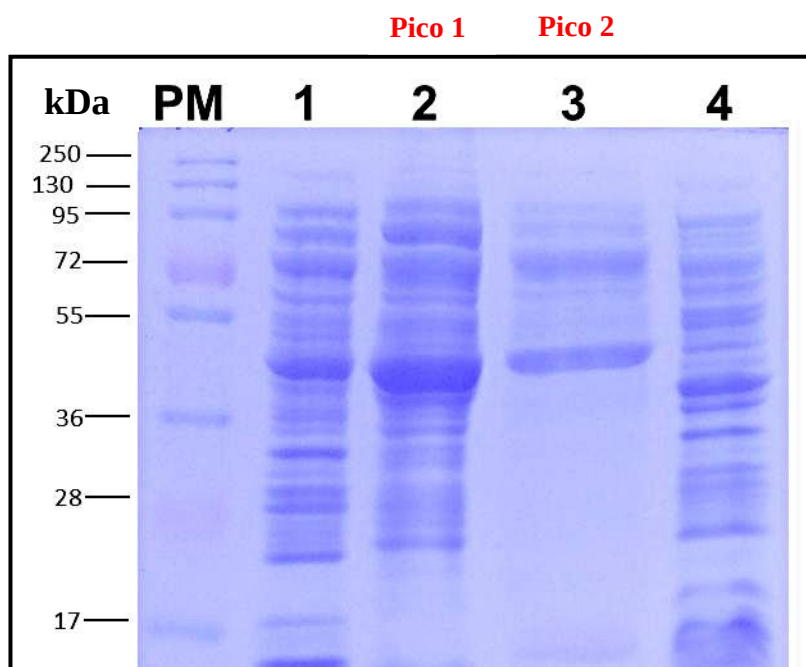


Figura 23. Purificação por troca iônica (Capto Q) da asparaginase solúvel expressa em *E. coli* pET28a-ASPII. Gel de SDS-PAGE a 12%; PM – Peso Molecular Page Ruler Plus (Thermo Scientific) 1 – Input da fração solúvel após lise celular; 2 – Pool de Frações do pico 1; 3 – Pool de Frações do pico 2; 4 – Flow Through (fração não retida na coluna).

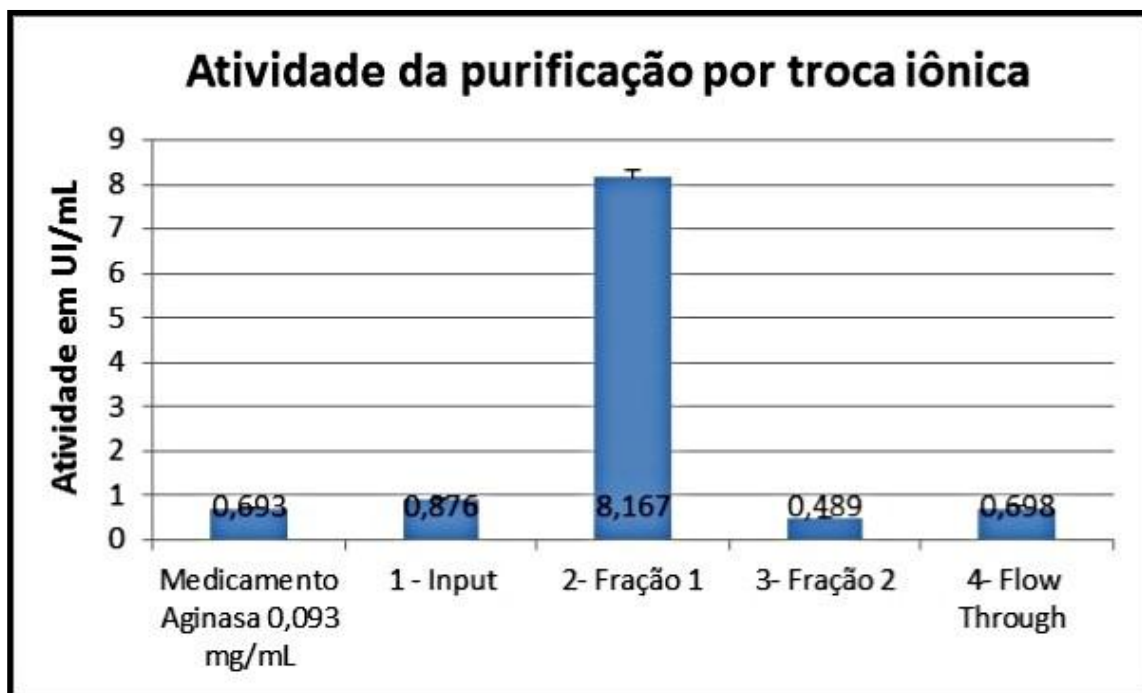


Figura 24. Atividade em UI/mL das frações purificadas por troca iônica (Capto Q) da asparaginase solúvel expressa em BL21 DE3 utilizando o plasmídeo pET28a-ASPII. Medicamento Aginasa em 0,093 mg/mL; 1 – *Input* da proteína solúvel após lise celular; 2 – Fração 1; 3 – Fração 2; 4 – *Flow Through* (amostra que não aderiu à coluna).

5.8. Purificação por IMAC da asparaginase da fração solúvel expressa por *E. coli* pET28a-ASPII

A fração solúvel obtida após a lise celular de *E. coli* pET28a-ASPII foi submetida ao processo cromatográfico de purificação por afinidade a níquel (IMAC) com a utilização de duas resinas acopladas da Histrap HP (GE) totalizando 10 mL do volume total da coluna. A eluição da asparaginase recombinante foi realizada em três *steps* utilizando fosfato de sódio 0,02 M, imidazol 0,5 M, NaCl 0,2 M. Para a eluição em pH 6,0, observou-se que a proteína se ligou à resina com níquel com auxílio da cauda de 6 histidinas (Figura 25) e pôde ser eluída com pureza maior do que a observada para a purificação por troca iônica (item 5.7). No entanto, nenhuma das frações purificadas, incluindo o *Flow Through*, apresentou atividade enzimática. Esta perda de atividade pode ser atribuída ao fato do pH estar próximo ao pI da asparaginase recombinante.

Na eluição em pH 7,0, a proteína apresentou pouca interação com a resina (figura 26). Nesta condição também não foi detectada atividade enzimática nas frações.

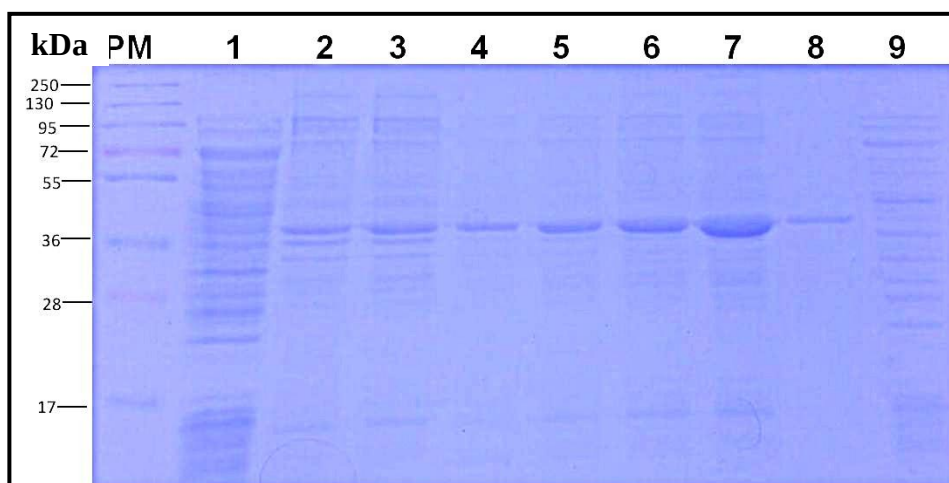


Figura 25. Purificação por afinidade (Histrap) em pH 6,0 da asparaginase II solúvel (*E. coli* BL21 DE3 pET28a-ASPII). Gel SDS-PAGE a 12%; PM – Peso Molecular Page Ruler Plus (Thermo Scientific) 1 – Input; 2 e 3 – Frações do pico 1; 4 a 8 – Frações do pico 2; 9 – Flow Through - FT (amostra não retida na coluna).

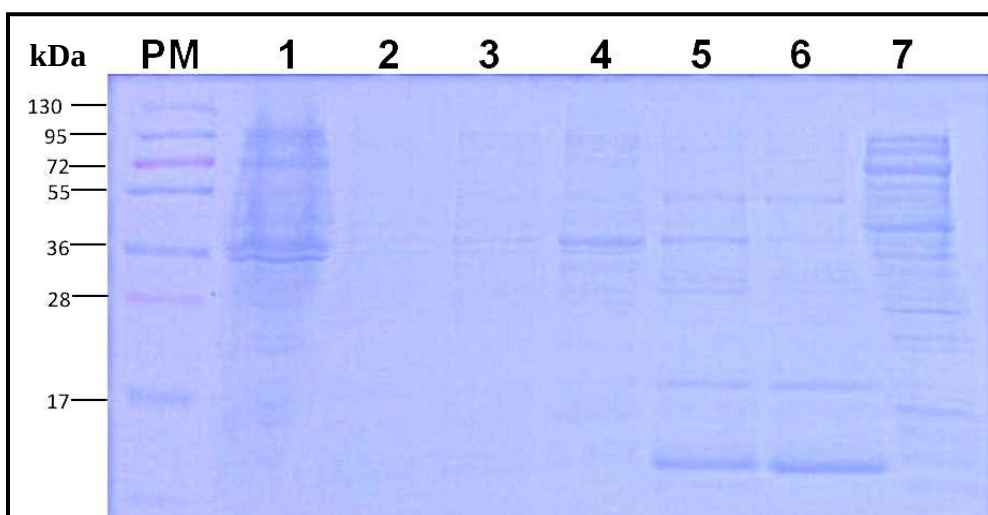


Figura 26. Purificação por afinidade (Histrap) em pH 7,0 da asparaginase II solúvel (*E. coli* pET28a-ASPII). Gel SDS-PAGE a 12%; PM – Peso Molecular Page Ruler Plus (Thermo Scientific) 1 – Input; 2 a 4 – Frações do pico 1; 5 a 6 – Frações do pico 2; 7 – Flow Through - FT (amostra que não ficou retida na coluna).

Devido à perda da atividade da asparaginase recombinante utilizando a metodologia de purificação por IMAC em pH 6,0 e 7,0, foi então realizado outro experimento nas mesmas condições, porém em pH 8,5. O cromatograma da purificação pode ser visualizado na Figura 27, onde é observada a formação de dois picos. Para o gel de SDS-PAGE, somente foram aplicadas as frações que apresentaram atividade enzimática (Figura 28). A atividade enzimática das frações purificadas, do *input* (sobrenadante após lise celular) e do *Flow Through* (amostra não retida na coluna) em UI/mL e UI/mg de proteína pode ser observada nas figuras 29 e 30, respectivamente.

A eletroforese indicou a presença da asparaginase de forma majoritária na canaleta do poço 6, com massa molecular aproximada de 38 kDa, compatível com a proteína estudada. Essa fração com maior grau de pureza apresentou 9,1 UI/mL, correspondendo 5,4 UI/mg de proteína (Figuras 28 e 29). Portanto, foi possível purificar a asparaginase II de *S. cerevisiae* recombinante, com atividade enzimática, por cromatografia de afinidade (IMAC). Khushoo *et al.* (2004) utilizaram essa mesma metodologia para purificar a asparaginase recombinante II de *E. coli*, obtendo atividade específica de 190 UI/mg de proteína, valor aproximado ao da asparaginase comercial de *E. coli* que é de 200 UI/mg de proteína (Khushoo *et al.*, 2004).

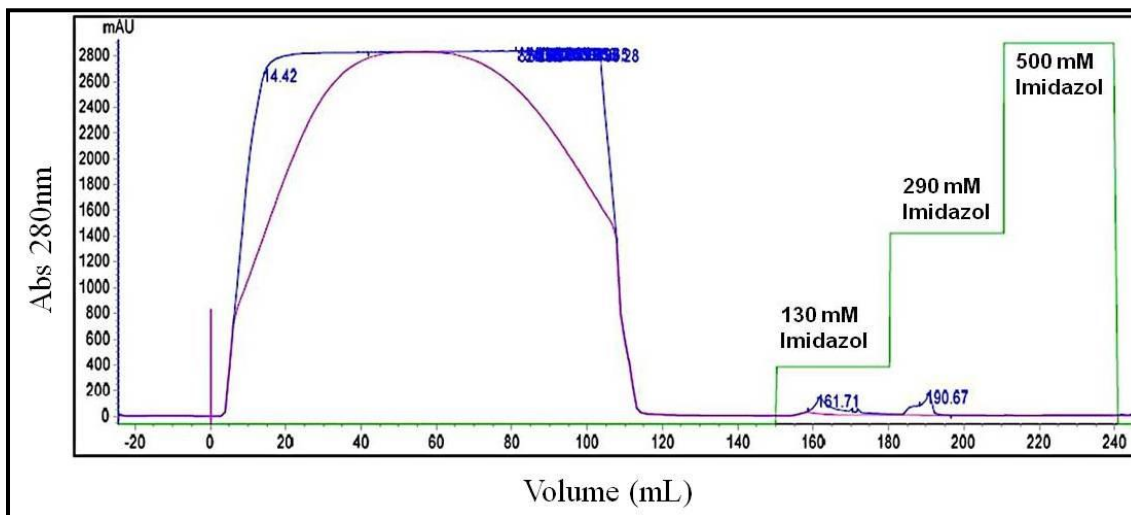


Figura 27. Cromatograma da purificação por IMAC da asparaginase solúvel expressa por *E. coli* pET28a-ASPII – Equipamento: AKTA Avant/GE. A eluição da proteína foi realizada em *steps* pelo aumento da concentração de imidazol em pH 8,5.

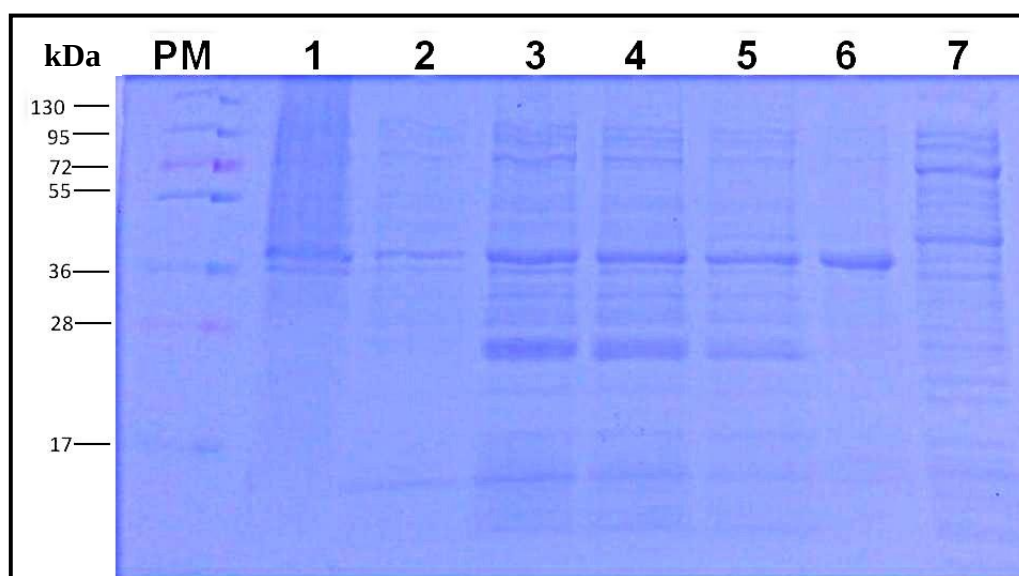


Figura 28. Purificação por afinidade (Histrap) em pH 8,5 da asparaginase solúvel (*E. coli* pET28a-ASPII). Gel de SDS-PAGE a 12%; PM – Peso Molecular *Page Ruler Plus* (Thermo Scientific). 1 – Input; 2 a 5– Frações do pico 1; 6 – Fração do pico 2; 7 – Flow Through - FT (amostra que não ficou retida na coluna).

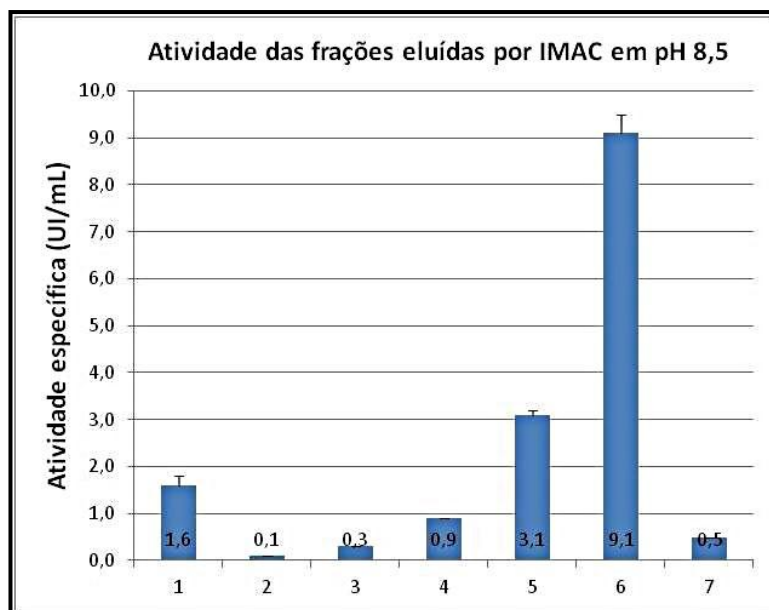


Figura 29. Atividade em UI/mL das frações eluídas por IMAC em pH 8,5. 1 – Input; 2 a 5– Frações do pico 1; 6 – Fração do pico 2; 7 – Flow Through - FT (amostra não retida na coluna).

Após a única etapa de purificação realizada por cromatografia de afinidade, a amostra com maior grau de pureza, fração purificada (canaleta 6), demonstrada no gel de SDS-PAGE (Figura 28), apresentou atividade específica de 5,4 UI/mg com fator de purificação de 18 vezes, correspondendo a 11,4 % de recuperação da atividade enzimática (Tabela 3).

Tabela 3. Etapas de purificação por IMAC da fração solúvel da asparaginase recombinante de *S. cerevisiae* expressa em *E. coli* pET28a-ASP11.

Etapas	Proteína (mg/mL)	UI/mL	Volume (mL)	Proteína total (mg)	UI	UI/mg	Fator de Purificação	Recuperação da atividade (%)
Fração solúvel	5,38	1,6	100	538	160	0,3	1	100
IMAC	1,7	9,1	2	3,4	18,2	5,4	18	11,4

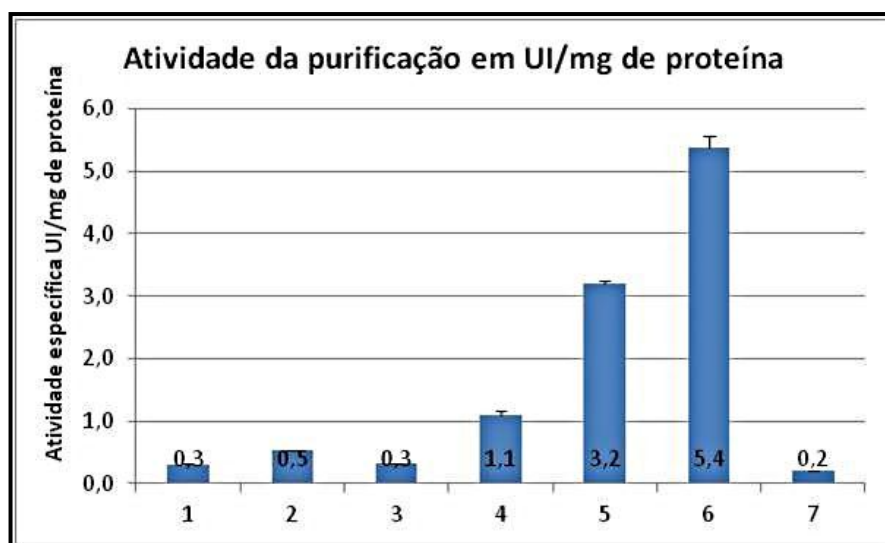


Figura 30. Atividade em UI/mg das frações eluídas por IMAC em pH 8,5 da construção *E. coli* pET28a-ASPII. 1 – *Input*; 2 a 5– Frações do pico 1; 6 – Fração do pico 2; 7 – *Flow Through* - FT (amostra que não ficou retida na coluna).

Com o objetivo de obter maior quantidade de amostra purificada para os ensaios posteriores de caracterização da asparaginase recombinante, foram acopladas quatro colunas (Histrap HP - GE) totalizando o volume total de coluna de 20,1 mL, foi possível aumentar a concentração da proteína com parcial purificação (Figura 31). A amostra detalhada nessa figura apresentou 26,6 UI/mL (Figura 32), De acordo com os dados da Tabela 4, a amostra foi purificada 15 vezes e apresentou atividade específica de 7,85 UI/mg, correspondendo a 18,71% de recuperação da atividade.

A asparaginase recombinante de *Pseudomonas aeruginosas* expressa em *E. coli* também foi purificada por IMAC, obtendo-se 14,4% de recuperação (Amany *et al.*, 2016).

Já a recuperação da purificação da dessa enzima expressa em *P. pastoris*, utilizando as colunas Superdex G-200 e Mono Q, foi de 51,3% (Girão *et al.*, 2016). Serão necessários outros ensaios de purificação da asparaginase II expressa em *E. coli*, com o intuito de aumentar a recuperação e também a homogeneidade da proteína purificada.

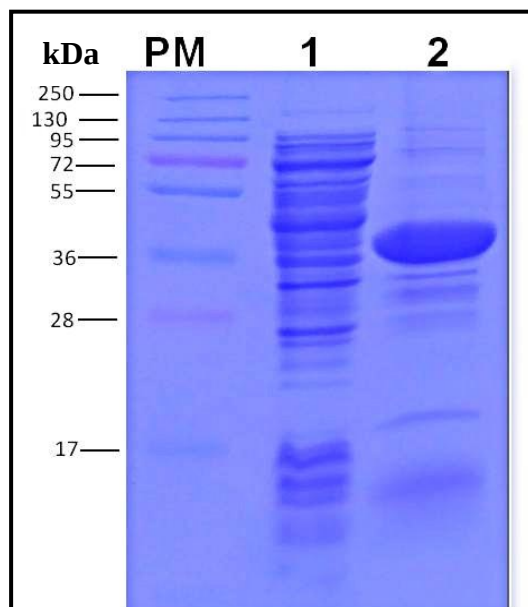


Figura 31. Purificação parcial por afinidade (com 4 colunas Histrap interligadas) em pH 8,5 da asparaginase II solúvel (*E. coli* pET28a-ASPII). Gel de SDS-PAGE a 12%; PM – Peso Molecular *Page Ruler Plus* (Thermo Scientific) 1 – Input 10 µL; 2 – Fração do pico 2 com maior atividade 10 µL;

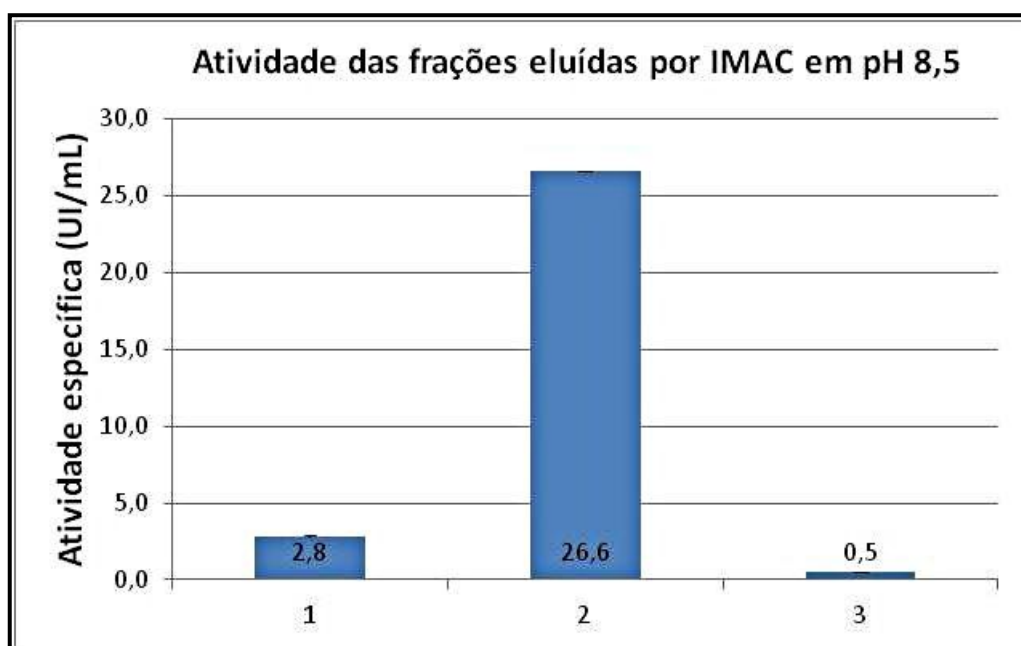


Figura 32. Atividade em UI/mL das frações eluídas por IMAC em pH 8,5 utilizando 4 colunas Histrap HP com 200 mL de extrato livre de células (após lise celular). 1 – *Input*; 2 – Frações do pico 2; 3 – *Flow Through* - FT (amostra não retida na coluna).

Tabela 4. Etapas de purificação da asparaginase recombinante de *S. cerevisiae* por IMAC com quatro colunas interligadas.

Etapas	Proteína (mg/mL)	UI/mL	Volume (mL)	Proteína total (mg)	UI	UI/mg	Fator de Purificação	Recuperação da atividade (%)
Extrato celular	5,38	2,8	200	1076	560	0,52	1	100
IMAC	3,39	26,6	4	13,56	106,4	7,85	15,1	19,0

5.9. Caracterização da asparaginase recombinante (fração solúvel) expressa por *E.coli* pET28a-ASP II purificada por IMAC

5.9.1. Determinação da Massa Molar

A exclusão molecular da enzima em condições nativas resultou na eluição de um pico majoritário, apresentando 90% da proteína total, com massa molecular estimada de 178 kDa (VE: 13.33 mL) (Figura 33), sugerindo que a asparaginase expressa em *E. coli* possui a conformação estrutural tetramérica. Esse resultado é diferente do verificado para a enzima expressa em *P. pastoris*, em que se observou uma proteína de 136 kDa em condições nativas, estimado por exclusão molecular (Girão *et al.*, 2016). Uma explicação para esta diferença na massa molar pode ser a utilização de diferentes matrizes de filtração em gel, no caso da proteína expressa em *P. pastoris* foi utilizada Sephacryl S200 (base acrilamida) e no presente trabalho, Superdex 200 (matriz dextrana). Estas diferenças na natureza da matriz podem gerar uma massa molar aparente diferente. Não há, até a presente data, dados disponíveis na literatura sobre a estrutura quaternária da asparaginase II nativa *S. cerevisiae*.

O resultado da massa molecular obtido no presente estudo é semelhante ao relatado para asparaginases isoladas de *E. coli* (Khushoo *et al.*, 2004), *E. chrysanthemi* (Gervais *et al.* 2013) e *E. carotovora* (Warangkar & Khobragade 2010). É interessante ressaltar que as asparaginases bacterianas produzidas por *E. coli* e *E. chrysanthemi* são tetraméricas (Aghaiypour *et al.*, 2001).

Além do pico correspondente à massa molar da proteína, foram observados três outros picos que podem corresponder à forma agregada (VE:8.26 mL) e, possivelmente, à forma monomérica (VE:17.15 mL). O último pico eluído com aproximadamente 20

mL pode corresponder à proteína de 10 kDa apresentada na figura 34, de acordo com curva de calibração ($y = -1.35 \cdot x + 2.26$, $R^2 = 0.994827$). Um quarto pico, com 24 mL, corresponde ao imidazol utilizado para eluir a proteína no processo de purificação.

A massa molecular do monômero da fração purificada por IMAC foi estimada por SDS-PAGE em condições desnaturantes, utilizando DTT, em torno de 38 kDa (Figura 34). Pela análise de massa molecular deduzida por bioinformática (protparam - <http://web.expasy.org/protparam/>) e a adição da cauda de histidina, mais o sítio de clivagem da trombina de ~2 kDa, a asparaginase deveria apresentar em torno de 37 kDa.

Girão e colaboradores (2016) descreveram duas isoformas da asparaginase II recombinante de *S. cerevisiae* expressa em *P. pastoris* com distintas massas moleculares 48,6 e 44,6 kDa. No entanto, após o tratamento da asparaginase II com PNGase F, que rompeu a glicosilação presente na proteína, esta passou a apresentar 42,9 kDa. A asparaginase I recombinante de *S. cerevisiae* expressa em *E. coli* apresentou massa molecular de aproximadamente 45 kDa (Costa *et al.*, 2016).

A proteína apresentou perfil eletroforético (Figura 34) similar na presença ou ausência de agente redutor (DTT), o que sugere a ausência de ponte dissulfeto. No entanto, Pinheiro (2015) descreveu a influência negativa de agentes redutores na atividade da asparaginase II de *S. cerevisiae* recombinante expressa em *P. pastoris*, que sugere a presença de pontes ponte dissulfeto na estrutura proteica. Resultado semelhante foi evidenciado para a asparaginase de *Bacillus aryabhattai* ITBHU02 (Singh *et al.*, 2013).

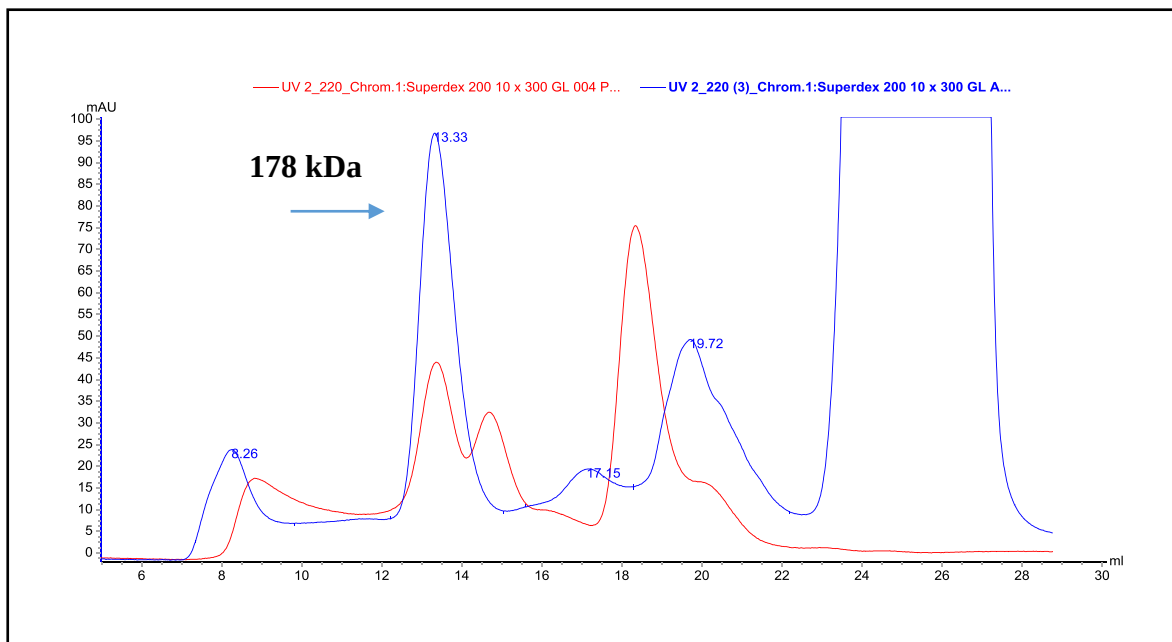


Figura 33. Perfil cromatográfico da asparaginase II recombinante em coluna Superdex 200 (10/30) – Abs 220nm. Em azul, perfil da amostra purificada por IMAC e em vermelho, os padrões de massas moleculares conhecidas: Blue Dextran (2000 kDa), Aldolase (150 kDa), Conalbumina (75 kDa) e Ribonuclease (13,7 kDa).

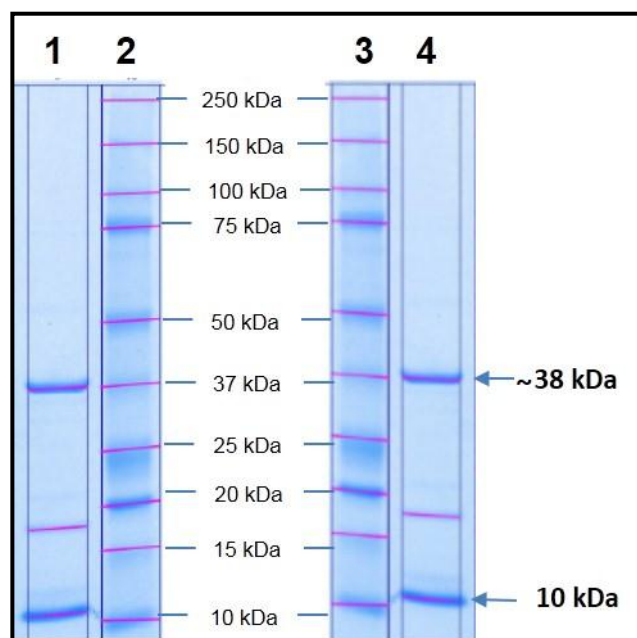


Figura 34. SDS-PAGE 12%. Determinação da Massa Molecular da asparaginase expressa em *E. coli* sem ou com a presença de DTT. 1– Fração que interagiu com a cromatografia de afinidade sem DTT; 2– Peso Molecular Dual Color (Bio-Rad); 3– Peso Molecular Dual Color (Bio-Rad); 4– Fração que interagiu com a cromatografia de afinidade com DTT.

Foram realizados seis experimentos para determinar a massa molar por espectrometria de massas. No entanto, a asparaginase não foi ionizada e não resultou em sinal espectrométrico. Parece que é uma característica da asparaginase II de *S. cerevisiae* de não ser ionizada, pois a asparaginase II glicosilada expressa em *P. pastoris* também não apresentou sinal espectrométrico ao ser analisada pela mesma metodologia (Girão *et al.*, 2016). Por outro lado, a L-asparaginase de *Thermococcus kodakaraensis* foi ionizada e apresentou sinal espectrométrico do monômero, observando-se em torno de 36 kDa (Chohan & Rashid, 2013). Serão necessários, portanto, outros estudos que possibilitem a determinação da massa molar dessa proteína recombinante.

5.9.2. Focalização Isoelétrica

A asparaginase purificada apresentou ponto isoelétrico experimental de 4,3 (Figura 35). Esse valor é ligeiramente inferior ao relatado para a enzima nativa de *S. cerevisiae* (4.69) (Dunlop e Roon, 1975) e para a enzima recombinante expressa em *P. pastoris* (4.5) (Girão *et al.*, 2016). Tal fato ocorreu, provavelmente, devido à asparaginase recombinante apresentar-se com sete aminoácidos a menos quando comparado à proteína nativa de *S. cerevisiae* (Girão *et al.*, 2016). Para efeitos comparativos, observa-se os intervalos relatados para o ponto isoelétrico da asparaginase nativa de *E. coli*, de 4.6-5.5, e da enzima nativa de *Erwinia*, de 8.7 (Howard e Carpenter, 1972).

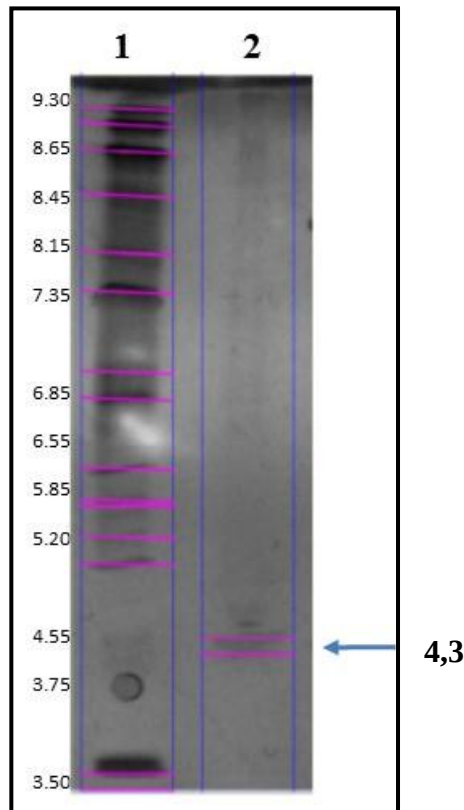


Figura 35. Focalização isoeletrica da asparaginase II em gel de poliacrilamida.

Raia 1 – Padrão pI 3-10 Broad (GE Healthcare); Raia 2 – Asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *E. coli* purificada por IMAC.

5.9.3. Avaliação da atividade glutaminásica

Uma das principais características desejáveis para a utilização da L-asparaginase no tratamento da LLA é a ausência da atividade glutaminásica (Ali *et al.*, 2016). No presente estudo, a atividade medida para o substrato L-glutamina correspondeu a apenas 2,2% da atividade medida para a L-asparagina (Figura 36). Esse valor é inferior ao exibido pela asparaginase de *Erwinia* (10%) e semelhante à da asparaginase comercial de *E. coli* (Narta *et al.*, 2007). Esse resultado é bastante interessante, pois a degradação da glutamina é responsável por efeitos adversos relacionados ao tratamento da LLA (Van Den Berg, 2011). A baixa atividade glutaminásica (0,72% da atividade asparaginásica) também foi evidenciada em experimentos com a asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *P. pastoris* (Pinheiro, 2015), sendo esta característica preservada na enzima desglicosilada. A asparaginase I de *S. cerevisiae* clonada e expressa em *E. coli* também apresentou baixa atividade glutaminásica (Costa *et al.*, 2016).

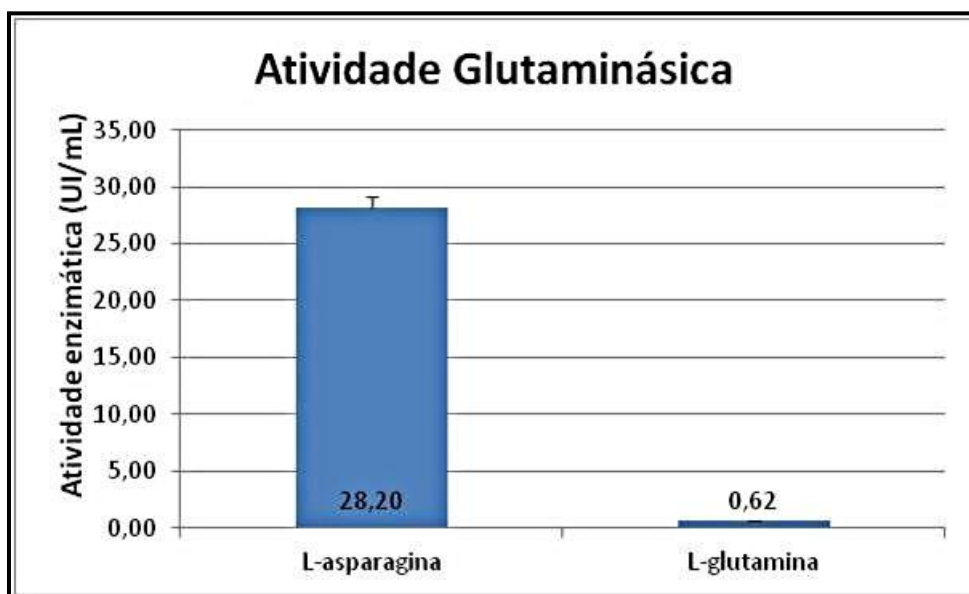
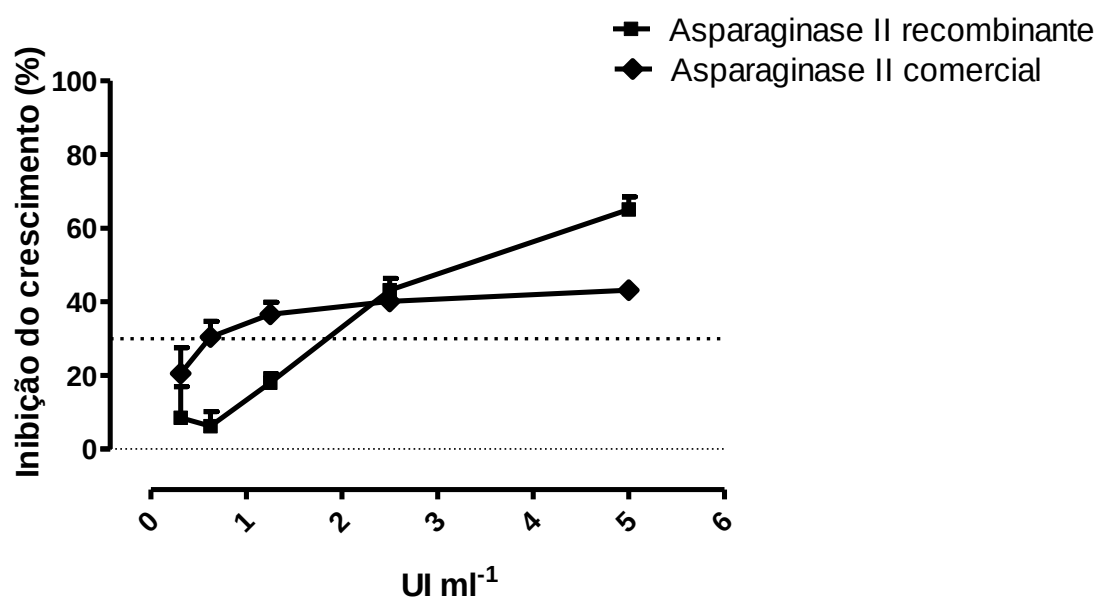


Figura 36. Avaliação da atividade glutaminásica da asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *E. coli* pET28a-ASPII. L-asparagina e L-glutamina: aminoácidos utilizados como substratos para análise da atividade da asparaginase II.

A L-asparaginase de fonte bacteriana contém atividade glutaminásica (Narta *et al.*, 2007). No entanto, outras enzimas estudadas de *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus kodakaraensis*, *Pseudomonas otitidis*, *Enterobacter cloacae* e *Nocardiopsis alba* não possuem atividade glutaminásica (Bansal *et al.*, 2010; Chohan and Rashid, 2013; Campbell *et al.*, 1967; Chohan and Rashid, 2013; Husain *et al.*, 2016; Meena *et al.*, 2016).

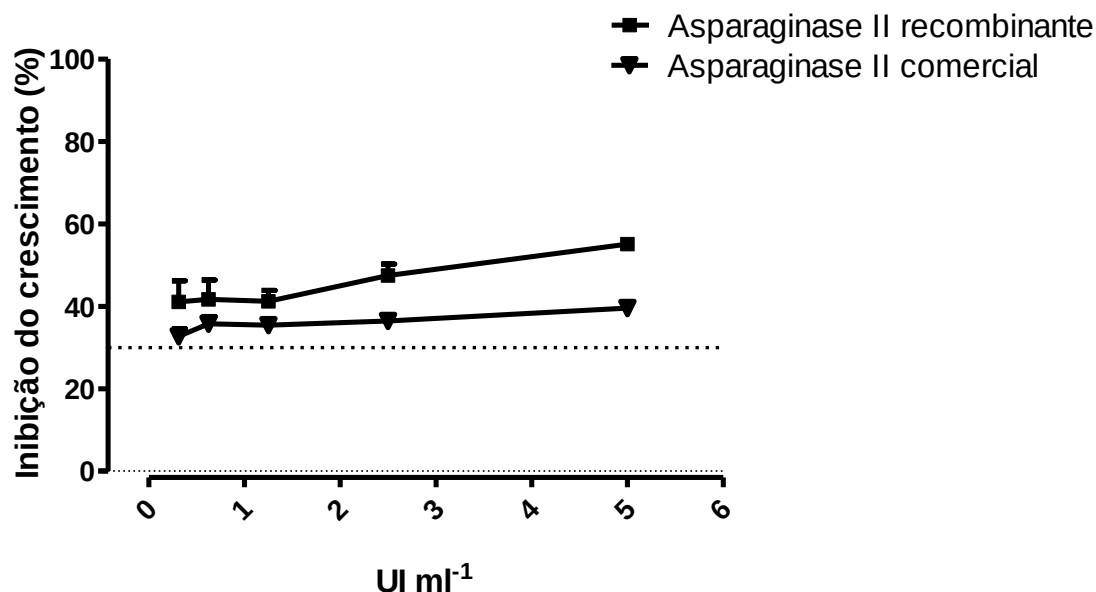
5.10. Atividade antitumoral *in vitro* da asparaginase recombinante

A asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *E. coli* foi capaz de inibir a proliferação de células K562 (leucemia mielóide crônica) e Jurkat (leucemia aguda de células T) (Figura 37 e Figura 38, respectivamente).



	Asparaginase II Recombinante	Asparaginase Comercial
IC ₅₀	3,632	3,351

Figura 37. Atividade antileucêmica, medida utilizando o MTT, da asparaginase II recombinante expressa em *E. coli* contra célula do tipo K562. Cada ponto representa a média de três valores de inibição da proliferação com os respectivos desvios padrão (barras de erro) para as várias concentrações de enzimas testadas.



	Asparaginase Recombinante II	Asparaginase Comercial II
IC ₅₀	1,775	3,414

Figura 38. Atividade antileucêmica, medida utilizando o MTT, da asparaginase II recombinante expressa em *E. coli* contra célula do tipo Jurkat. Cada ponto representa a média de três valores de inibição da proliferação com os **respectivos** desvios padrão (barras de erro) para as várias concentrações de enzimas testadas.

O tratamento da linhagem celular K562 com a asparaginase II inibiu a proliferação de uma maneira dose-dependente, com IC₅₀ de 3,6 UI/mL, comparável ao IC₅₀ calculado para a asparaginase comercial (3,3 UI/mL; Fig.37). Curiosamente, o valor de IC₅₀ obtido neste estudo para asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *E. coli* é menor do que o descrito para a mesma enzima expressa em *P. pastoris* (Girão *et al.*, 2016), para a qual o IC₅₀ foi de 5.85 UI/mL. Este achado sugere que a asparaginase II de *S. cerevisiae* recombinante expressa em *E. coli* possui melhor desempenho e não requer glicosilação para manter a atividade antileucêmica *in vitro*.

Quando testado na linhagem celular Jurkat, o IC₅₀ calculado para a asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *E. coli* foi de 1,775 UI/mL (Figura 38), inferior ao da asparaginase comercial utilizada como controle, que apresentou IC₅₀ 3,414 UI/mL (Aginasa). Neste estudo, observamos que a linhagem celular Jurkat é mais suscetível ao tratamento utilizando a asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *E. coli* que a

linhagem celular K562, pois nas concentrações mais baixas testadas, observamos uma inibição mais significativa da proliferação de Jurkat. Os resultados obtidos indicam que a asparaginase II de *S. cerevisiae* recombinante expressa em *E. coli* possui características promissoras para a utilização como medicamento para o tratamento da LLA.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A expressão recombinante da asparaginase II de *S. cerevisiae* em *E. coli* utilizando pET28a-ASPII foi realizada de forma intracelular e solúvel, obtendo-se 225,6 UI/g de célula;
- ✓ Após lise celular, esta proteína foi purificada por afinidade a níquel, obtendo-se uma fração purificada com atividade específica de 7,9 UI/mg e grau de purificação de 15 vezes, correspondendo a 18,7 % de recuperação da atividade enzimática;
- ✓ Para a construção *E. coli* pET28a-ASPII foi observada também a formação de proteína insolúvel (corpúsculo de inclusão) que, entretanto, não apresentou significativa atividade enzimática após tentativas de reatualamento e purificação;
- ✓ A proteína expressa utilizando pET22b-ASPII ocorreu para o meio extracelular, com atividade enzimática. No entanto, observou-se perda total da atividade enzimática após tentativas de purificação por afinidade a níquel e troca iônica;
- ✓ Aparentemente a glicosilação não é um fator essencial para manter a atividade da asparaginase recombinante de *S. cerevisiae*, pois a enzima expressa em *E. coli*, sem glicosilação, apresentou atividade enzimática;
- ✓ A massa molar da subunidade da asparaginase II expressa em *E. coli* em gel desnaturante foi de aproximadamente 38 kDa, enquanto a forma nativa, estimada por cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200, foi de 178 kDa, sugerindo uma estrutura tetramérica para a proteína;
- ✓ O ponto isoelétrico da asparaginase recombinante foi 4,3, próximo ao pI da proteína expressa em *P. pastoris*, de 4,5;
- ✓ A asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *E. coli* apresentou baixa atividade glutaminásica. Mesma característica apresentada pela proteína glicosilada expressa em *P. pastoris*;
- ✓ A asparaginase II expressa em *E. coli* apresentou atividade antitumoral contra as linhagens celulares de leucemia K562 e Jurkat de maneira dose-dependente;
- ✓ A asparaginase II expressa em *E. coli* possui características promissoras para utilização como medicamento para o tratamento de LLA;

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Planejamento experimental para melhorar as condições de expressão solúvel em *E. coli*;
- ✓ Clonagem do gene *ASP3* em outros vetores de expressão visando a expressão extracelular e permanência da atividade da enzima;
- ✓ Clonagem do gene com códons otimizados para *E. coli* para melhorar a expressão solúvel e atividade específica da enzima;
- ✓ Melhoramento do processo de purificação da enzima recombinante;
- ✓ Ensaios de oligomerização com MS para identificação da massa molar por espectrometria de massas;
- ✓ Estudo da estabilidade da proteína recombinante;
- ✓ Ensaios de citotoxicidade em linhagens de células normais;
- ✓ Avaliação da imunogenicidade da enzima recombinante.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AHMED MM., NAGEH ABO DAHAB F., *et al.* Production, Purification and Characterization of L-Asparaginase from Marine Endophytic *Aspergillus sp.* ALAA-2000 under Submerged and Solid State Fermentation. J Microb Biochem Technol. 7:165-172. 2015.

ABAKUMOVA O.Y., PODOBED O.V., *et al.* Antitumor activity of L-asparaginase from *Erwinia caratovora* against different human and animal leukemic and solid tumor cell lines. Biomed. Khim. 6307–316. 2012.

ABUCHOWSKI, A., VAN ES, T., *et al.* Treatment of L5178Y tumor-bearing BDF1 mice with a no immunogenic L-glutaminase-L-asparaginase. Cancer Treat Rep. 63, 1127-1132. 1979.

ALI, U., NAVEED, M., *et al.* L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (LLA): A novel approach to target LLA. European Journal of Pharmacology. 771, 199-210. 2016.

AGENCIA.FIOCRUZ.BR. (18 de 06 de 2013). agencia.fiocruz.br. Acesso em 14 de 04 de 2018, disponível em agencia.fiocruz.br: <https://agencia.fiocruz.br/brasil-vai-ampliar-produ%C3%A7%C3%A3o-de-medicamentos-biol%C3%B3gicos>.

AGHAIYPOUR, K., WLODAWER, A., *et al.* Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. Biochemistry. 40: 5655-64. 2001.

AHLKE, E., NOWAK-GOTTL, U., *et al.* Dose reduction of asparaginase under pharmacokinetic and pharmacodynamics control during induction therapy in children with Acute Lymphoblastic Leukemia. BJH. 96, 675-681. 1997.

ALTSCHUL SF., MADDEN TL., *et al.* Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389–3402. 1997.

AMANY S., EL-SHARKAWY, AIDA M. FARAG., *et al.* Cloning, expression and characterization of aeruginosa EGYII L-Asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain EGYII DSM 101801 in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic. 132:16-23. 2016.

ANVISA (17 de 04 de 2018). http://portal.anvisa.gov.br: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/nota-autorizacao-para-importacao-da-l-asparaginase/219201/pop_up?inheritRedirect=false

ANTONIOU G, PAPAKYRIACOU I, PAPANEOPHYTOU C. Optimization of Soluble Expression and Purification of Recombinant Human Rhinovirus Type-14 3C Protease Using Statistically Designed Experiments: Isolation and Characterization of the Enzyme. Mol Biotechnol. 59(9-10):407-424. 2017.

APPEL IM., KAZEMIER KM., *et al.* Pharmacokinetic, pharmacodynamics and intracellular effects of PEG-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: results from a single agent window study. Leukemia. 22:1665–1679. 2008.

ASSELIN BL., WHITIN JC., *et al.* Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. J Clin Oncol. 11:1780–1786. 1993.

AUNG, H.P., BOCOLA, M., *et al.* Dynamics of a mobile loop at the active site of *Escherichia coli* asparaginase. Biochim Biophys Acta. 1481, 349–59. 2000.

AVRAMIS, V. I., & PANOSYAN, E. H. Pharmacokinetic/pharmacodynamics relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. Clin Pharmacokinet. 44, 367-93. 2005.

BANSAL, S., GNANESWARI, D., *et al.* MISHRA, P., KUNDU, B. Structural stability and functional analysis of L-asparaginase from *Pyrococcus furiosus*. Biochem. 75, 375-381. 2010.

BATOOL T., MAKKY EA., *et al.* A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. Appl Biochem Biotechnol. 178,900-23. 2016.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. Anal Biochem. 72: 248-54. 1976.

BROOME, J.D. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. Nature. 191, 1114-1115. 1961.

BOOS, J., WERBER, G., *et al*. Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. Eur J Cancer. 32, 1544-1550. 1996.

BON, E.P., CARVAJAL, E., *et al*. Asparaginase-II of *Saccharomyces cerevisiae*. GLN3/URE2 regulation of a periplasmic enzyme. Appl Biochem Biotechnol. 63-65, 203-212, 1997.

BORKOTAKY B, BEZBARUAH RL. Production and properties of asparaginase from a new *Erwinia* sp. Folia Microbiol. 47:473–6. 2002.

BURKE D., DAWSON D., *et al*. Methods in Yeast Genetics a Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual. New York, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 2000.

CAMPBELL HA., MASHBURN LT., *et al*. Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. Their separation, purification, and antitumor activity. Biochemistry. 6: 721-730. 1997.

CEDAR, H., SCHWARTZ, J.H. Localization of the two-L-asparaginases in anaerobic LLA grown *Escherichia coli*. J Boil Chem. 242, 3753-3755. 1967.

CEDAR H., SCHWARTZ JH. Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*. J Bacteriol. 96: 2043-2048. 1968.

CORNELIS P: Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. Curr Opin Biotechnol. 11:450–454. 2000.

COSTA IM, SCHULTZ L., *et al.* Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. Sci Rep. 6:36239. 2016.

SCHEIN CH, NOTEBORN MHM: Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. Nat Biotechnol. 6:291-294. 1988.

CHOHAN SM., RASHID N. TK1656, a thermostable L-asparaginase from *Thermococcus kodakaraensis*, exhibiting highest ever reported enzyme activity. J Biosci Bioeng. 116(4):438-43. 2013.

CLAY AS., And HAINLINE BE. Hyperammonemia in the ICU. Chest. 132(4): 1368–1378. 2007.

DASH C., MOHAPATRA SB., *et al.* Optimization, purification, and characterization of L-asparaginase from *Actinomycetales bacterium BkSoiiA*. Prep Biochem Biotechnol. 46:1-7. 2016.

D'ANDREA, MARIANA GAMA. Caracterização Físico-Química da Asparaginase de *Escherichia coli*. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Estrutural. 2012.

DELLINGER CT., MIALE TD. Comparison of anaphylactic reactions to asparaginase derived from *Escherichia coli* and from *Erwinia* cultures. Cancer. 1976.

DERST, C., HENSELING, J., *et al.* Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase. II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. Protein Sci. 9, 2009-2017. 2000.

DEUTSCHER, J.; FRANCKE, C., *et al.* How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70; 939–1031. 2006.

DESHPANDE N., CHOUBEY P., *et al.* Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. Scientific World Journal. 29;895167. 2014.

DUVAL M., SUCIU S., *et al.* Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. Blood. 99 (8):2734-9. 2002.

DUNLOP, P.C.; ROON, R.J. L-asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: an Extracellular Enzyme. Journal of Bacteriology, 223: 1017-1024, 1975.

DUNLOP PC., MEYER GM., *et al.* Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 253: 1297–1304, 1978.

DUNLOP, P.C., MEYER, G.M., *et al.* “Reactions of Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. A mechanistic analysis of hydrolysis and hydroxylaminolysis”. The Journal of Biological Chemistry. 255:1542-1546. 1980.

EARL M. Incidence and management of asparaginase-associated adverse events in patients with acute lymphoblastic leukemia. Clin Adv Hematol Oncol. 7:600–606, 2009.

EVANS WE., TSIATIS A., *et al.* Anaphylactoid reactions to *Escherichia coli* and *Erwinia* asparaginase in children with leukemia and lymphoma. Cancer. 49:1378–1383. 1982.

EINSFELDT, K. Desenvolvimento de uma nova L-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* para aplicação como biofármaco. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE. 2014.

FANG M, HUANG HL. Advances in vitro refolding of inclusion body proteins. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 17:608-12. 2001.

FERRARA, MARIA ANTONIETA; MATTOSO, JOSIANE M. V., *et al.*. Kinetics of Asparaginase II Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae ure2dal80* Mutant: Effect of Nitrogen Nutrition and pH. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 113:299-306, 2004.

FERRARA, M. A. ; SEVERINO, N., *et al.* Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. *Enzyme and Microbial Technology*. 39:1457-1463. 2006.

FERRARA, M.A., SEVERINO, N. M.B., *et al.* High yield extraction of periplasmic asparaginase produced by recombinant *P. pastoris* harbouring the *S. cerevisiae* ASP3 gene. *Enzyme Microb Technol.* 2010.

GERVAIS D., ALLISON N., *et al.* Validation of a 30-year-old process for the manufacture of L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 36:453–60. 2013.

GILBERT HJ., BLAZEK R., *et al.* Cloning and expression of the *Erwinia chrysanthemi* asparaginase gene in *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*. *J Gen Microbiol.* 132:151–160. 1986.

GIRÃO LFC., ROCHA SLG., *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II, a potential antileukaemic drug: purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 120, 118-125. 2016.

GIRÃO LFC. Escalonamento da purificação, estudo estrutural e formulação de asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* clonada e expressa em *Pichia pastoris*. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2017.

GRIGOROPOULOS, N.F., PETTER, R., *et al.* Leukemia update. Part 1: diagnosis and management. *BMJ.* 346.1660. 2013.

GUO, Q.L., WU, M.S., *et al.* “Comparison of antitumor effect of recombinant L-asparaginase with wild type one *in vitro* and *in vivo*”. *Acta Pharmacologica Sinica.* v.23, n.10, p.946-951. 2002.

HENDRIKSEN H.V., KORNBRUST B.A., *et al.* Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*, J Agric Food Chem. 57, 4168–4176. 2009.

HOWARD, J.B. CARPENTER, F.H. L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Substrate specificity and enzymatic properties J Biol Chem., 247.1020–1030. 1972.

HUSAIN I, SHARMA A., *et al.* Purification and Characterization of Glutaminase Free Asparaginase from *Enterobacter cloacae*: *In Vitro* Evaluation of Cytotoxic Potential against Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. PLoS One.18; 11. 2016a.

HUSAIN I, SHARMA A., *et al.* Purification and characterization of glutaminase free asparaginase from *Pseudomonas otitidis*: Induce apoptosis in human leukemia MOLT-4 cells. Biochimie. 121:38-51, 2016b.

INCA, 2014. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA. 2014.

IZADPANAHI QESHMI F., HOMAEI A., *et al.* Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. Microbiol Res. 208:99-112.2018.

JAMES HS, JANE YR., *et al.* Two L-asparaginases from *E. coli* and their action against tumours. J Appl Microbiol. 56:1516–19. 1966.

JHAMB K, SAHOO DK. Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. Bioresour Technol.123:135-43. 2012.

JONES GE. Genetic and physiological relationships between L-Asparaginase I and Asparaginase II in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 130: 128–130. 1977a.

- JONES GE. Genetics of expression of Asparaginase-II activity in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 129: 1165–1167. 1977b.
- JONES AJ. The use of an animal immunogenicity model in the development of protropin somatrem (methionyl human growth hormone). Dev Biol. 109:107–118. 2002.
- JORNAL DO BRASIL (17 de 04 de 2018). Jornal do Brasil. Fonte: Ciência e Tecnologia:<http://www.jb.com.br/ciencia-e-tecnologia/noticias/2017/04/11/anm-se-manifesta-obre-importacao-de-asparaginase-chinesa-pelo-ministerio-da-saude/>.
- KAVITHA A., VIJAYALAKSHMI M. Optimization and purification of L-asparaginase produced by *Streptomyces tendae* TK-VL_333. Z Naturforsch C. 65:528-31. 2010.
- KARAMITROS CS., LABROU N. Extracellular expression and affinity purification of L-asparaginase from *E. chrysanthemi* in *E. coli*. Sustainable Chemical Processes. 2:16. 2014.
- KATJA M. J., HEITINK-POLLÉ, BERTHIL H. C. M. T., *et al.* High Incidence of Symptomatic Hyperammonemia in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia Receiving Pegylated Asparaginase. JIMD Rep. 7: 103–108. 2013.
- KEBRIAEI P, ANASTASI J., *et al.* LARSON, RA. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and classification. Best Pract Res Clin Haematol. 15: 597-21. 2003.
- KISHORE V., NISHITA KP., *et al.* Cloning, expression and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens* for large-scale production in *E. coli* BL21. Biotech. 5:975-981. 2015.
- KIDD J G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum—course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum or rabbit serum. J Exp Med. 98:565–82. 1953.
- KIM, K.W.; KAMERUDA, J.Q., *et al.* Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of the ASP3 gene. Journal of Biological Chemistry. 263: 11948-11953. 1988.

KIRIYAMA Y, KUBOTA M., *et al.* Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. Leukemia. 3:294–297, 1989.

KHUSHOO A, PAL Y., *et al.* Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. Protein Expr Purif. 38:29–36. 2004.

KHUSHOO A, PAL Y., *et al.* Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. Appl Microbiol Biotechnol. 68:189–197. 2005.

KOTZIA GA., LABROU NE. Cloning, expression and characterization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. J Biotechnol. 119: 309-323. 2005.

KOTZIA GA., LABROU NE. L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. J Biotechnol. 20:127:657-69. 2007.

KOZAK, M., JASKÓLSKI, M., *et al.* “Preliminary crystallographic studies of Y25F mutant of periplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase”, Acta Biochimica Polonica. 47, n.3, p.807–814. 2000.

KOZAK, M., BOREK, D., *et al.* Crystallization and Preliminary crystallographic studies of five crystal forms of *Escherichia coli* L-asparaginase II (Asp90Glu mutant). Acta Crystllogr. DBiol. 58, 130–132. 2002.

KUHLMANN, M., COVIC, A. The protein science of biosimilars. Nephrol Dial Transplant. 5, 4-8. 2006.

KURTZBERG. “L-asparaginase”, In: Holland-Frei Cancer Medicine, 5 ed., Editora Hamilton (ON): BC Decker. 2000.

LAEMMLI, U. K. “Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4”, Nature, v. 193, pp. 680-685. 1970.

LEAGUE GP., SLOT JC., *et al.* The *ASP3* locus in *Saccharomyces cerevisiae* originated by horizontal gene transfer from *Wickerhamomyces*. FEMS Yeast Res. 12:859-63. 2012.

LIU JJ., LI J., *et al.* Cloning and expression of the *E. coli* asparaginase gene in *Escherichia coli*. J Chin Pharm Univ. 27:696–700. 1996.

LOCKWOOD AH., MCDONALD JM., *et al.* The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and Hyperammonemia. J Clin Invest. 63:449–460. 1979.

LOPES AM., OLIVEIRA-NASCIMENTO L., *et al.* Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. Crit Rev Biotechnol. 37:82-99. 2015.

LUHANA, K., DAVE, A., *et al.* Production, purification and characterization of extracellular L-asparaginase (Anti Cancerous Enzyme) from *Aspergillus niger*. Int J Chem Appl. 2, 3. 2013.

MASETTI, R., & PESSION, A. First-line treatment of acute lymphoblastic leukemia with pegasparaginase. *Biologics: Targets & Therapy* 3, 359–368. 2009.

MASHBURN, L.T. & WRISTON, J. C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase. Biochem Biophys Res Commun. 12, 50-55. 1963.

MASHBURN, L. T. & WRISTON, J. C. Tumor Inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. Arch Biochem. Biophys. 105, 451-52. 1964.

MEGHAVARNAM AK., SALAH M., *et al.* Growth inhibitory and proapoptotic effects of l-asparaginase from *Fusarium culmorum* ASP-87 on human leukemia cells (Jurkat). Fundam Clin Pharmacol. 292-300. 2017.

MEHTA, R.K., VERMA, S., *et al.* Mutations in subunit interface and B-cell epitopes improve antileukemic activities of *Escherichia coli* asparaginase-II: evaluation of immunogenicity in mice. J Biol Chem. 289, 3555-3570. 2014.

MEENA B., ANBURAJAN, L., *et al.* Molecular expression of l-asparaginase gene from *Nocardia alba* NIOT-VKMA08 in *Escherichia coli*: a prospective recombinant enzyme for leukaemia chemotherapy. Gene. 590. 220-226. 2016.

MEZENTSEV IUV., MOL'NAR AA., *et al.* Oligomerization of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Biomed Khim. 52:258-71. 2007

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (13 de 04 de 2018). <http://portalms.saude.gov.br>. Fonte: <http://portalms.saude.gov.br:http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/27975-ministerio-fez-consulta-mundial-para-compra-de-asparaginase>.

MINGMEI JIA., MEIJUAN XU., *et al.* Cloning, Expression, and Characterization of l-Asparaginase from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* B11-06. J Agric Food Chem. 61,9428-9434. 2013.

MISHRA A. Production of L-Asparaginase, an Anticancer Agent, from *Aspergillus niger* Using Agricultural Waste in Solid State Fermentation. Appl Biochem Biotechnol. 135, 33-42. 2006.

MOHAMED SA., ELSHAL MF., *et al.* Characterization of Asparaginase from *Phaseolus vulgaris* Seeds. Evid Based Complement Alternat Med. 2015:309214. 2015.

MOHAMED SA., ELSHAL MF., *et al.* L-Asparaginase Isolated from *Phaseolus vulgaris* Seeds Exhibited Potent Anti-Acute Lymphoblastic Leukemia Effects *In-Vitro* and Low Immunogenic Properties *In-Vivo*. Int J Environ Res Public Health.14;13. 2016.

MOHAMMADINEZHAD R, FARAHMAND H., *et al.* Efficient osmolyte-based procedure to increase expression level and solubility of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) nucleoprotein in *E. coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 102:4087-4100. 2018.

MOOLA, Z. B., SCAWEN M. D., *et al.* *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenic modified enzymes. Biochemical Journal, 302, 3 921-927. 1994.

MOORTHY V., RAMALINGAM A., *et al.* Production, purification and characterization of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus sp.* African J Microbiol Research. 4:1862-1867. 2010.

MÜLLER, H.J., BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood LLA. Critical Reviews in Oncology: Hematology. 28: 97–113.1998.

MULLER HJ., BEIER R., *et al.* Pharmacokinetics of native *Escherichia coli* asparaginase (Asparaginase medac) and hypersensitivity reactions in LLA-BFM 95 reinduction treatment. Br J Haematol. 114:794–799. 2001.

NAGARETHINAM, S., NAGAPPA, A. N., *et al.* Microbial L-Asparaginase and its future prospects. Asian J Med Res. 1:159-168. 2012.

NARTA UK., KANWAR SS., *et al.* Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. Crit Rev Oncol Hematol. 61: 208-21. 2007.

NOMME J, SU Y, LAVIE A. Elucidation of the specific function of the conserved threonine triad responsible for human L-Asparaginase autocleavage and substrate hydrolysis. J Mol Biol. 426:2471–85. 2014.

NUSSBAUM V., LUBCKE N., *et al.* FINDLAY R. Hyperammonemia secondary to asparaginase: A case series. J Oncol Pharm Pract. 22(1):161-4. 2016.

OLIVEIRA BM., VIANA MB., *et al.* Avaliação da adesão ao tratamento através de questionários: estudo prospectivo de 73 crianças portadoras de leucemia linfoblástica aguda. J Pediatr. 81: 245-50. 2005.

PARKIN D.M., STILLER C.A., *et al.* The international incidence of childhood cancer. Int J Cancer; 42: 511-520. 1988.

PARMENTIER, J.H., MAGGI, M., *et al.* Glutaminase activity determines cytotoxicity of L-asparaginases on most leukemia cell lines. Leuk Res. 39, 757-762. 2015.

PASUT & VERONESE. “PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview”. Advanced Drug Delivery Reviews. 61, p.1177–1188. 2009.

PHARMACIA BIOTECH. PhastSystem™ – User Manual. Uppsala (Suécia): Pharmacia LKB Biotechnology AB. 1990.

PHILLIPS RM., SALEEM MU., *et al.* Abstract C154: Kinetic analysis of the glutaminase activity of L-asparaginases derived from *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase) and *Escherichia coli* (Kidrolase). Mol Cancer Ther 12:C154. 2013.

PERES B. S., PADILHA G., *et al.* Questões relevantes para a aprovação de medicamentos biossimilares. Rev Bras Epidemiol; 15: 748-60. 2012.

PINHEIRO, ADRIANA MICHELLI SILVA. Avaliação das propriedades bioquímicas e físico-químicas da enzima asparaginase produzida por *Pichia pastoris* recombinante. Dissertação de mestrado. Instituto de Tecnologia em Fármacos, Farmanguinhos, Pós Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica. 2015.

PRAJNA RAO KRISHNAPURA, PRASANNA D. BELUR., *et al.* A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases. Critical Reviews in Microbiology.42:5. 2016.

PRIHANTO AA., WAKAYAMA M. Combination of environmental stress and localization of L-asparaginase in *Arthrospira platensis* for production improvement. 3 Biotech. 4:647-653. 2014.

PUI C-H, SLLAAN S., *et al.* International childhood acute lymphoblastic leukemia workshop: Sausalito, CA, 30. Leukemia.15: 707-15. 2001.

ROSANO GL., CECCARELLI EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Front Microbiol. 17;5:17.2014.

RYTTING M. Peg-asparaginase for acute lymphoblastic leukemia. Expert Opin Biol Ther.10:833–839. 2010.

- RYTTING, M.E. “Role of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: focus on adult patients”, *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy*. 2, 117–124. 2012.
- SAEED H, ALI H., SOUDAN H., *et al.* Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* asparaginase in *Escherichia coli*. *Int J Biol Macromol*. 106:1041-1051. 2018.
- SAHDEV S., KHATTAR S. K., *et al.* Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem*. 307 249–264 10. 2008.
- SAMBROOK, J; FRITSCH, EF., *et al.* Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANCHES, M.; KRAUCHENCO, S., *et al.* Structure, Substrate Complexation and Reaction Mechanism of Bacterial Asparaginases. *Current Chem. Biol*. 1, 75-86. 2007
- SANTOS JHPM, COSTA IM., *et al.* Heterologous expression and purification of active L-asparaginase I of *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* host. *Biotechnol Prog*. 33:416-424. 2017.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463-7.1977.
- SARQUIS MI, OLIVEIRA EM., *et al.* Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99:489-92. 2004.
- SEZONOV, G., JOSELEAU-PETIT., *et al.* *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol*. 189, 8746–8749. 2007.
- SCHWARTZ JH, REEVES JY., *et al.* Two L-asparaginases from *E. coli* and their action against tumors. *PNAS*. 56:1516-1519. 1966.
- SHRIVASTAVA, A., KHAN, A. A., *et al.* Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. *Biochemistry and Biotechnology*, 42, 574–581. 2012.

SHRIVASTAVA A., KHAN AA., *et al.* Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 100, 1–10. 2015.

SILVERMAN LB., GELBER RD., *et al.* Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. Blood. 97: 1211–1218. 2001.

SINCLAIR K., WARNER JP & BONTHRON DT. The *ASP1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the intracellular isozyme of L-asparaginase. Gene. 144: 37–43. 1994.

SINGH Y.; GUNDAMPATI R K., *et al.* Extracellular L-Asparaginase from a Protease-deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: Purification, Biochemical Characterization and Evaluation of Antineoplastic Activity *In Vitro*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 171:1759-1774- 116, 299-305. 2013.

STECHER A.L., DEUS M. P., *et al.*, “Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. Pharmaceutica Acta Helvetiae.74, p.1-9. 1999.

SOARES, A. L., GUIMARÃES, G. M., *et al.* Effects of Polyethylene Glycol Attachment on Physicochemical and Biological Stability of *E. coli* L-Asparaginase, International Journal of Pharmaceutics. 237, pp. 163-170. 2002.

SPADA, S., WALSH G. Directory of approved biopharmaceutical products. Boca Raton London New York Washington, DC: CRC press. 2005.

SWAIN, A.L., JASKOLSKI, M., *et al.* Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 90, 1474–1478. 1993.

TERPE K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol. 72:211-22. 2006.

TONG L, LIN Q., *et al.* Extracellular expression, purification, and characterization of a winter flounder antifreeze polypeptide from *Escherichia coli*. Protein Expr Purif. 18: 175-181. 2000.

TONG WH., VAN DER SLUIS IM., *et al.* Cost-analysis of treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia with asparaginase preparations: the impact of expensive chemotherapy. Haematologicay. 98:753-9. 2013.

UPADHYAY AK., SINGH A., *et al.* Refolding and purification of recombinant l-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. Front Microbiol. 5:486. 2014.

VAN DEN BERG H. “Asparaginase revisited”, Leukemia & Lymphoma. 52, 2, 168–178. 2011.

VIDYA, J. VASUDEVAN, U.M., *et al.* Cloning, Functional Expression and Characterization of L-Asparaginase II from *E. coli* MTCC 739. Food Technology and Biotechnology. 49, 3; 286-290. 2011.

VIDYA, J., SAJITHA S., *et al.* Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: An overview. Bioresour Technol. 245:1775-1781.2017.

VILA PB, GARCIA CP., *et al.* Leucemia mínima residual: nuevo concepto de remisión completa. An Pediatr. 63: 390-5. 2005.

VROOMAN LM, SUPKO JG., *et al.* *Erwinia Asparaginase* after allergy to *E. coli* Asparaginase in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. Pediatric blood & cancer. 54:199-205. 2010.

YOSHIMOTO, T., NISHIMURA, H., *et al.* Characterization of polyethylene glycol-modified L-asparaginase from *Escherichia coli* and its application to therapy of Leukemia. Jpn J Cancer Res. 77, 1264-1270. 1986.

WARANGKAR SC, KHOBRADE CN. Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-asparaginase. Enzyme Res. 165878. 2010.

WANG Y, QIAN S., *et al.* Cloning and expression of L-asparaginase gene in *Escherichia coli*. Appl Biochem Biotechnol. 93-101, 2001.

WINK PL, BOGDABA HM., *et al.* Comparison between Two *Erwinia carotovora* L-Asparaginase II Constructions: cloning, Heterologous Expression, Purification, and Kinetic Characterization. J Microbial Biochem Technol. 2:013-019. 2010.

ZEIDAN A, WANG ES., *et al.* Pegasparaginase: where do we stand? Expert Opin Biol Ther. 9:111-9. 2009.

Yu Z, Zheng H, Zhao X., *et al.* High level extracellular production of a recombinant alkaline catalase in *E. coli* BL21 under ethanol stress and its application in hydrogen peroxide removal after cotton fabrics bleaching. Bioresour Technol. 214:303-310. 2016.