UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

L-asparaginase de E*rwinia chrysanthemi:* expressão proteica livre de células e bioconjugação a bacteriófagos

Guilherme Meira Lima

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra.Gisele Monteiro

SÃO PAULO
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

L-asparaginase de E*rwinia chrysanthemi:* expressão proteica livre de células e bioconjugação a bacteriófagos

Guilherme Meira Lima

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra.Gisele Monteiro

SÃO PAULO
2020

Guilherme Meira Lima

L-asparaginase de Erwinia chrysanthemi: expressão proteica livre de células e bioconjugação a bacteriófagos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Gisele Monteiro

Orientadora/Presidente

_____

1o. examinador

_____

2o. examinador

_____

3o. examinador

_____

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da US

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L7321

Lima, Guilherme Meira
L-asparaginase de Erwinia chrysanthemi: expressão proteica livre de células e bioconjugação a bacteriófagos / Guilherme Meira Lima. - São Paulo, 2020.
157 p.

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

1. Biotecnologia farmacêutica. 2. Leucemia. 3. Bacteriófagos. 4. Biologia molecular. 5. Asparaginase. I. T. II. Monteiro, Gisele, orientador.

DEDICATÓRIA

À minha família, pelos ensinamentos de vida e pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À professora Gisele Monteiro, pela confiança em me receber como aluno de iniciação científica e depois como aluno de mestrado, e pelo suporte e ensinamentos oferecidos os quais contribuíram substancialmente para o meu amadurecimento acadêmico e profissional.

Aos meus pais, Arlete e Nataniel, por todo o apoio durante minhas escolhas profissionais e acadêmicas e por terem investido na minha educação.

Aos meus irmãos, Dario e Hugo, pelo companheirismo eterno.

Aos meus amigos e padrinhos de casamento Pedro e Arthur, pelas conversas amistosas e pelos momentos de lazer tidos nas horas vagas.

Aos meus colegas de laboratório da professora Gisele Monteiro, em especial à Íris, ao Henrique, à Massiel, ao Tales e ao Brian, pelas conversas e discussões científicas frutíferas.

Aos meus sogros Helena e Elcio, pelas conversas e momentos inesquecíveis compartilhados em família.

Ao professor Ratmir Derda por ter me aceito realizar estágio acadêmico em seu laboratório e ter me oferecido todo o suporte necessários durante todos os momentos da pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório do laboratório do professor Ratmir Derda, pelas conversas e ajudas oferecidas durante todo o estágio.

À professora Solange Serrano e à Milene do Instituto Butantã, por toda o suporte científico referente aos experimentos de síntese proteíca livre de células.

Aos funcionários da FCF-USP pelo suporte acadêmico e administrativo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das primeiras mensalidades de bolsa do meu mestrado (Código de Financiamento 001).

À Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao projeto temático (processo n° 2013/08617-7), pela concessão das minha bolsas de mestrado e de iniciação científica (processos n° 2018/15041-8 e 2016/15787-4), e pelo financiamento do meu estágio no exterior (processo n° 2019/09354-6).

E à minha esposa Bárbara Félix Ramos, pelo carinho e companheirismo durante todos esses anos. Por sonharmos e sermos felizes juntos.

EPÍGRAFE

Knowledge is power. Information is liberating. Education is the premise of progress, in every society, in every family”

- Kofi Annan

RESUMO

LIMA, G. M. **L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi:* expressão proteica livre de células e bioconjugação a bacteriófagos. 2020. 157f.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A L-Asparaginase (L-ASNase) de *Erwinia chrysathemi* (ErA) é uma enzima amplamente utilizada para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA). Embora o seu uso como segunda linha de tratamento para a LLA tenha proporcionado consideráveis benefícios clínicos, reações de hipersensibilidade e rápida depuração plasmática ainda são problemas recorrentes. Ademais, extensivos e custosos processos de produção da ErA são necessários para a obtenção da enzima pura. Com base nesses problemas, o presente trabalho propõe (1) o estudo de viabilidade de expressão da ErA em um sistema de síntese proteica livre de células (SPLC) e (2) a conjugação da proteína em bacteriófagos como ferramenta alternativa para o isolamento e monitoramento da depuração plasmática da ErA. Foram utilizados extratos celulares de *Escherichia coli* suplementados com solução energética contendo creatina fosfato (CP) como fonte de energia para síntese *in vitro* de ErA. Para conjugação da ErA a bacteriófagos, o sistema *SpyTag*/*SpyCatcher* foi implementado: *SpyCatcher* foi fusionado à porção N-terminal da ErA e bacteriófagos filamentosos da linhagem M13 e fd foram modificados de modo a expressar *SpyTag* nas proteínas de capsídeo pIII e pVIII, respectivamente. Em relação ao primeiro objetivo, o sistema de SPLC foi capaz de expressar a ErA com atividade. A proteína foi expressa na fração solúvel e apresentou atividade enzimática significativamente superior em relação à reação controle (7,07 ± 0,68 U/mL vs. 1,83 ± 0,14 U/mL). Tempo necessário para obtenção do extrato celular foi reduzido de 45 para 26 hrs, e sete componentes da solução energética foram removidos da composição original sem implicações negativas na eficiência de expressão da ErA, simplificando desta forma o processo de SPLC. Em relação ao segundo objetivo, ErA fusionada à *SpyCatcher* (*SpyCatcher*_ErA) foi conjugada com êxito em bacteriófagos capazes de expressar *SpyTag* fusionadas na porção N-terminal das proteínas pIII (*SpyTag*_pIII) e pVIII (*SpyTag*_pVIII). A porcentagem de formação dos conjugados entre *SpyCatcher*_ErA e *SpyTag*_pIII ($(ErA)_5$-pIII) foi de 6% enquanto formação dos conjugados entre *SpyCatcher*_ErA e *SpyTag*_pVIII

((ErA)$_{50}$-pVIII) foi de 46%, valores estes confirmados por atividade enzimática. Solução contendo conjugados foram injetados em camundongos e sequenciados/titulados com êxito. Não houve diferença de depuração plasmática entre (ErA)$_5$-pIII e bacteriófago controle, mas houve maior taxa de eliminação de (ErA)$_{50}$-pVIII em relação ao mesmo bacteriófago não conjugado à *SpyCatcher*_ErA. Os resultados aqui apresentados confirmam ser possível expressar ErA com atividade biológica em sistemas de SPLC. Além disso, o sistema de conjugação da ErA a bacteriófagos aqui desenvolvido foi capaz de monitorar a concentração de ErA presente na circulação em função do tempo, tornando-se uma potencial plataforma de desenvolvimento de novas proteoformas da ErA com características clínicas melhoradas.

Palavras-chave: L-asparaginase, erwinase, síntese proteica livre de células, *SpyCatcher*, *SpyTag*, bioconjugação, cepuração plasmática, biofármacos

ABSTRACT

LIMA, G. M. **L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi:* cell-free protein expression and bioconjugation to bacteriophages.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

L-Asparaginase (L-ASNase) from *Erwinia chrysanthemi* (ErA) is a widely used enzyme for treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). Although its use as a second-line treatment has provided significant clinical benefits, hypersensitivity reactions and a fast clearance rate are recurring L-ASNase-related problems. In addition, extensive and costly production processes are required for the manufacturing of pure ErA. Based on these drawbacks, this current work proposes (1) the study of the use of a cell-free protein synthesis (CFPS) system as a viable platform for the synthesis of ErA and (2) the conjugation of the protein on bacteriophages as an alternative tool for the isolation and monitoring of ErA clearance. *Escherichia coli*-derived cell extracts supplemented with a creatine phosphate-based energy solution were used to synthesize ErA *in vitro.* To conjugate ErA on bacteriophages, the SpyTag/SpyCatcher system was implemented: SpyCatcher was fused to the N-terminus of the ErA while filamentous phage strains M13 and fd were engineered in order to display SpyTag on their pIII and pVIII capsid proteins, respectively. Regarding the first goal, the CFPS system was able to express an active ErA. The protein was expressed in the soluble fraction and there presented a significant higher enzymatic activity compared to the control reaction (7.07 ± 0.68 U/mL vs. 1.83 ± 0.14 U/mL). Time required to obtain the cell extract was reduced from 45 to 26 hours, and seven energy solution reagents were removed from the original solution without compromising the efficiency of ErA expression, thus simplifying the CFPS process. With respect to the second goal, ErA fused to SpyCatcher (SpyCatcher_ErA) was sucessfully conjugated on bacteriophages capable of displaying SpyTag fused to the N-terminus of the pIII (SpyTag_pIII) or pVIII (SpyTag_pVIII) proteins. Percentage of conjugate formation between SpyCatcher_ErA and SpyTag_pIII $(ErA)_5$-pIII was 6% whereas conjugate formation between SpyCatcher_ErA and SpyTag_pVIII $(ErA)_{50}$-pVIII was 46%, values that were confirmed by enzymatic activity. Sample containing conjugates were injected into mice and sucessfully sequenced/titrated. No clearance differences were observed between $(ErA)_5$-

pIII and a control bacteriophage, but a higher clearance rate was observed for $(ErA)_{50}$-pVIII compared to SpyTag_VIII non conjugated to SpyCatcher_ErA. The results here presented confirm the expression of a biologically active ErA from a CFPS system. Besides, the development of a conjugation system capable of linking ErA to bacteriophages could be used as a means to monitor the ErA concentration in the blood as a function of time and also as a potential platform to be used in the development of novel ErA proteoforms with improved clinical properties.

Keywords: L-asparaginase, erwinase, cell-free protein synthesis, Spycatcher, Spytag, bioconjugation, plasmatic clearance, biopharmaceutical

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação simplificada de uma reação de SPLC..... 22
Figura 2. Mecanismo de reação das enzimas L-ASNase e ASNS..... 37
Figura 3. Reação de conjugação entre duas proteínas contendo aminoácidos reativos não naturais em sua estrutura..... 40
Figura 4. Representação das partes biológicas *SpyCatcher* e *SpyTag*..... 41
Figura 5. Esquematização da estratégia de obtenção do gene *ansB* de *E. chrysanthemi* do vetor pET15b..... 49
Figura 6. Esquematização do segundo passo de clonagem para obtenção do vetor final ErA_pSB1A2..... 51
Figura 7. Comparação de métodos para obtenção de extratos proteicos..... 58
Figura 8. Tempo de preparação e eficiência dos extratos celulares obtidos por prensa francesa..... 61
Figura 9. Testes de otimização da solução energética com base na expressão da GFP. 64
Figura 10. Resultado do SDS-PAGE e *Western Blotting* referente às amostras de proteínas contidas nas frações solúvel e insolúvel das reações de SPLC..... 69
Figura 11. Purificação por IMAC de ErA produzida por SPLC..... 70
Figura 12 Atividades enzimáticas da ASNase resultantes de reações de SPLC usando diferentes construções plasmidiais..... 71
Figura 13. *Western blotting* de diferentes reações de SPLC contendo diferentes contruções plasmidiais como DNA molde..... 72
Figura 14. Atividade enzimática da ErA em diferentes reações de SPLC..... 74
Figura 15. Detecção por MALDI dos conjugados obtidos após reação de conjugação com o azido-peptídeo “YW-XIII-85”..... 90
Figura 16. Verificação da modificação de RNase A..... 92
Figura 17. Detecção do consumo da proteína pVIII conjugada com DBCO..... 93
Figura 18. Detecção da conjugação pVIII e RNAse A..... 94
Figura 19. Avaliação da expressão e atividade de ErA e SpyCatcher_ErA..... 96
Figura 20. Frações eluídas do processo de purificação por cromatografia de afinidade de ambas as ErA recombinantes..... 97
Figura 21. Alinhamento local entre as sequências (a) *SpyCatcher*_ErA e *SpyTag* e (b) ErA e *SpyTag*..... 98
Figura 22. Sequências *SpyTag* degeneradas e de clones selecionados..... 99
Figura 23. Detecção da proteína recombinante *SpyTag*_pVIII por MALDI..... 100
Figura 24. Ensaio de inibição da ErA por DON e derivados..... 101
Figura 25. Análise da formação de bioconjugados $(ErA)_5$-pIII e $(ErA)_{50}$-pVIII..... 103
Figura 26. Análise das atividades enzimáticas dos conjugados $(ErA)_5$-pIII e $(ErA)_{50}$-pVIII após reação de conjugação com *SpyCatcher*_ErA purificada..... 104
Figura 27. Comparação entre as quantidades formadas de conjugado baseadas em cálculos de densitometria ou atividade enzimática..... 105
Figura 28. A conjugação de *SpyTag*_pVIII e *SpyCatcher*_ErA não requer de purificação de *SpyCatcher*_ErA..... 106
Figura 29. Quantificação de partículas virais antes e depois da injeção por qPCR..... 109

Figura 30. Eliminação de bacteriófagos da corrente sanguinea medido pela proporção do número de *hits* encontrados para cada clone, coletados de dados de sequenciamento..... 110
Figura 31. Proporção entre o número de *hits* de *SpyTag*_pIII e SVEK detectador por sequenciamento para cada preparação de clones em diferentes concentrações..... 111
Figura 32. Eliminação de bacteriófagos da corrente sanguinea medido pelo número de placas observadas para *SpyTag*_pIII, SVEK e $(ErA)_5$-pIII..... 112
Figura 33. Eliminação de bacteriófagos da corrente sanguinea medido pelo número de colônias resistentes à tetraciclina..... 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de reagentes estoque..... 47
Tabela 2. Concentração final dos reagentes utilizados nas reaçãoes de SPLC para síntese *in vitro* das proteínas ErA e GFP..... 52
Tabela 3. Lista de todos os reagentes originalmente utilizados na solução energética e suas principais funções biológicas..... 63
Tabela 4. Diferentes concentrações de MgAc e DTT utilizadas para reações de expressão da ErA em sistema SPLC..... 67
Tabela 5. Lista de manuscritos aceitos ou em processo de aceite/elaboração desenvolvidos durante o período do mestrado..... 122

LISTA DE ABREVIATURAS

$(ErA)_5$-pIII	L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* fusionada à proteína *SpyCatcher* e fusionada ao bacteriófago *SpyTag*_pIII
$(ErA)_{50}$-pVIII	L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* fusionada à proteína *SpyCatcher* e fusionada ao bacteriófago *SpyTag*_pVIII
3-PGA	Ácido 3-fosfoglicérico (do inglês *3-Phosphoglyceric Acid*)
AcAmm	Acetato de Amônio
AGT	O^6-alquilguanina-DNA alquiltransferase
AMPc	AMP cíclico
ASNS	Asparagina sintetase
Azido	Éster de NHS ácido 8-azido-octanoico
BCIP	Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (do inglês *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*)
CAT	Cloranfenicol acetiltransferase
CFU	Unidade formadora de colônia (do inglês *Colony-Forming Unit*)
CHO	Células de ovário de hamster chinês (do inglês *Chinese hamster ovary*)
CoA	Coenzima A
CP	Creatina fosfato (do inglês *Creatine Phosphate*)
CDPT	Cicloadição dipolar promovida por tensão
DBCO-NHS	Éster de dibenzociclo-octino-N-hidroxisuccinimidílico
DHFR	Dihidrofolato redutase
DO	Densidade ótica
DON	6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucina
epPCR	PCR propensa a erro (do inglês *error-prone PCR*)
EPO	Eritropoetina
ErA	L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi*
G6P	Glicose-6-Fosfato (do inglês *Glucose-6-Phosphate*)
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês *Green Fluorescent Protein*)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos (do inglês *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)
HTS	Triagem de alta produtividade (do inglês *High Throughput Screening*)
IDT	*Integrated DNA Technologies*
IMAC	Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (do inglês *Immobilized Metal Affinity Chromatography*)
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
IRES	Sítios internos de entrada de ribossomos (do inglês *internal ribosome entry site)*
L-ASNase	L-asparaginase

LCMS	Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (do inglês *Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization*)
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)
NBT	Azul de nitro-tetrazólio (do inglês *Nitro Blue Tetrazolium*)
NMPs	Nucleosídeos monofosfatos (do inglês *Nucleoside Monophosphates*)
NTPs	Nucleosídeos trifosfatos (do inglês *Nucleoside Triphosphates*)
pAz	p-Azido-L-fenilalina
PCR	Reações em cadeia de polimerização de DNA (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
PEG	Polietilenoglicol
PEG-ASNase	L-Asparaginase PEGuilada de *Escherichia coli*
PEP	Fosfoenolpiruvato (do inglês *Phosphoenolpyruvate*)
PFU	Unidade formadora de placas (do inglês *Plaque-forming Unit)*
PSA	Persulfato de amônio
pPa	p-Propargiloxifenilalanina
PVDF	Fluoreto de polivinilideno (do inglês *Polyvinylidene difluoride*)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês *Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)
SPLC	Síntese Proteica Livre de Células
Spm	Espermidina
*SpyCatcher*_ErA	L-Asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* fusionada à proteína *SpyCatcher*
*SpyTag*_pIII	Bacteriófago filamentoso M13 capaz de expressar o peptídeo *SpyTag* na posição N-terminal da proteína pIII
*SpyTag*_pVIII	Bacteriófago filamentoso fd capaz de expressar o peptídeo *SpyTag* na posição N-terminal da proteína pVIII
SVEK	Bacteriofago filamentoso M13 capaz de expressar o peptídeo SVEKNDQKTYHAGGG na posição N-terminal da proteína pIII
TD	Toxina diftérica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS 19
1.1 INTRODUÇÃO 19
1.1.1 A L-ASPARAGINASE COMO BIOFÁRMACO 19
1.1.2 O SISTEMA DE SÍNTESE PROTEICA LIVRE DE CÉLULAS COMO ALTERNATIVA22
1.1.3 OS CUSTOS DA TECNOLOGIA 28
1.1.4 APLICAÇÕES DA TECNOLOGIA DE SPLC 30
1.1.5 PRODUÇÃO DA ErA EM SISTEMAS DE SÍNTESE PROTEICA LIVRE DE CÉLULAS36
1.1.6 EXPANDINDO O ALCANCE DA TECNOLOGIA 37
1.2 OBJETIVOS 42
1.2.1 OBJETIVOS PRINCIPAIS 42
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 42

2 CAPÍTULO I – EXPRESSÃO DA L-ASPARAGINASE EM PLATAFORMA DE SÍNTESE PROTEICA LIVRE DE CÉLULAS 43
2.1 INTRODUÇÃO 43
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS 45
2.2.1 Meios de Cultivo 45
2.2.2 Preparação do Extrato Celular por Sonicação 45
2.2.3 Preparação do Extrato Celular por Homogeneização em Alta Pressão 46
2.2.4 Solução Energética 47
2.2.5 Obtenção dos Vetores 48
2.2.6 Reação de SPLC 52
2.2.7 Purificação da ErA 53
2.2.8 Concentração de Proteínas Totais 53
2.2.9 Fluorescência 54
2.2.10 Ensaio Enzimático 54
2.2.11 Eletroforeses 54
2.2.12 Western Blotting 55
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
2.3.1 Desenvolvimento do Extrato Celular 57
2.3.2 Desenvolvimento da Solução Energética 61
2.3.3 Construção do Plasmídeo e Expressão da ErA 66
2.4 CONCLUSÃO 77

3 CAPÍTULO II – BIOCONJUGAÇÃO DA L-ASPARAGINASE EM BACTERIÓFAGOS 78
3.1 INTRODUÇÃO 78
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS 80
3.2.1 Meios de Cultivo 80
3.2.2 Conjugação Química de Peptídeos/Proteínas em Bacteriófagos 80
3.2.3 Clonagem e Expressão da SpyCatcher_ErA 81
3.2.4 Purificação da ErA e da SpyCatcher_ErA 81
3.2.5 Clonagem do Peptídeo SpyTag nos Genomas Virais 82

3.2.6 Seleção de Clones de Bacteriófagos *83*
3.2.7 Amplificação de Bacteriófagos *83*
3.2.8 Síntese de Moléculas Derivadas de 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucina (DON) *84*
3.2.9 Conjugação da SpyCatcher_ErA a Bacteriófagos *84*
3.2.10 Estudos in vivo e Processamento de Amostras de Sangue *85*
3.2.11 qPCR *85*
3.2.12 Sequenciamento Illumina *86*
3.2.13 Titulação de Bacteriófagos *86*
3.2.14 Purificação de Conjugados *87*
3.2.15 Ensaio Enzimático *87*
3.2.16 Eletroforeses *87*
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 89
3.3.1 Abordagem Química *89*
3.3.2 Abordagem Biológica *94*
3.3.3 Inibidor Suicida da ErA *100*
3.3.4 Conjugação da SpyCatcher_ErA a Bacteriófagos contendo SpyTag *102*
3.3.5 Experimentos in vivo *107*
3.4 CONCLUSÃO 116

4 DISCUSSÃO GERAL 117

5 PERSPECTIVAS FUTURAS 119

6 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO 121

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 124

APÊNDICES 137
APÊNDICE A - Lista de Sequências 137
APÊNDICE B - Curvas de Calibração 140
APÊNDICE C - Síntese Moléculas Derivadas de DON 141
APÊNDICE D – Mapas dos Vetores 142
APÊNDICE E - Valores Cq 145
APÊNDICE F - Segundo PCR 146
APÊNDICE G - Titulação de Bacteriófagos 147

ANEXOS 148
ANEXO A - Ficha do Aluno 148
ANEXO B - Artigo #1 150
ANEXO C - Artigo #2 151
ANEXO D - Artigo #3 152
ANEXO E - Artigo #4 (Em Análise – Scientific Reports) 153
ANEXO F - Artigo #5 (Em Elaboração) 154
ANEXO G - Pôster 155
ANEXO H - IGEM 156
ANEXO I - Aprovação CIBIO 157

1 INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Neste trabalho, serão apresentados importantes resultados referentes a dois objetivos científicos envolvendo o estudo da L-Asparaginase (L-ASNase) de *Erwinia chrysanthemi* (ErA). O primeiro objetivo (detalhado no Capítulo I desta dissertação) se refere ao desenvolvimento e a otimização de um novo sistema de expressão livre de células capaz de expressar a ErA. O segundo objetivo (detalhado no Capítulo II desta dissertação), por sua vez, se baseia fundamentalmente no desenvolvimento de uma nova plataforma de conjugação biológica da ErA a bacteriófagos e suas aplicações *in vivo*. Embora os objetivos possuam aplicações distintas, existe na realidade um grande potencial de complementação e benefício mútuo entre esses dois estudos, discussão esta que será levantada com mais detalhes na seção "Discussão Geral", juntamente com as conclusões finais desta dissertação. Por fim, serão descritas demais atividades acadêmicas desenvolvidas no decorrer do curso.

A seguir será apresentada uma revisão literária dos principais conceitos científicos envolvidos neste projeto, mais especificamente, as características bioquímicas e aplicações da L-ASNase; as bases teóricas, usos e custos da tecnologia de síntese proteica livre de células e, por fim, as potenciais estratégias de expansão desta tecnologia envolvendo o uso da bioconjugação.

1.1.1 A L-ASPARAGINASE COMO BIOFÁRMACO

A L-Asparaginase (L-ASNase) é uma importante enzima utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA). A LLA é um tipo de câncer que acomete principalmente crianças e adolescentes com uma incidência estimada de 1,6 casos a cada 100.000 habitantes nos Estados Unidos, totalizando por volta de 6.500 casos por ano (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). No Brasil, estima-se que haja uma média de 10.810 novos casos de leucemia por ano, sendo 5.920 destes casos prevalecentes em homens e 4.890 em mulheres (INCA, 2020). Graças à incorporação da L-ASNase nos protocolos terapêuticos, estima-se que a taxa de sobrevivência a este tipo de câncer, em pacientes pediátricos especificamente, esteja em

torno de 90%, embora valores mais modestos sejam observados em pacientes adultos (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

A eficácia da L-ASNase no tratamento da LLA está instricamente relacionada à sua atividade enzimática. Ao hidrolisar o aminoácido asparagina (Asn) em aspartato (Asp) e amônia, a L-ASNase é capaz de diminuir as concentrações de Asn na corrente sanguínea do paciente. Em células humanas saudáveis, a Asn é um aminoácido não essencial, e por conta disso, elas possuem a habilidade de sintetizar sua própria Asn a partir de outras fontes, especialmente glutamina (Gln). Por outro lado, as células leucêmicas, por serem incapazes de sintetizar sua própria fonte de Asn (células leucêmicas possuem atividade de asparagina sintetase reduzida ou nula), não conseguem prosseguir com suas atividades metabólicas essenciais e por isso acabam morrendo por apoptose, favorecendo com isso o tratamento do paciente (MARINI et al., 2017).

Atualmente, existem três principais tipos de L-ASNase disponíveis no mercado para o tratamento da LLA: L-ASNase de *Escherichia coli*, L-ASNase PEGuilada de *E. coli* (PEG-ASNase) e L-ASNase de *E. chrysanthemi* (ErA) (PIETERS et al., 2011). Dentre as diferenças observadas entre estes tipos de L-ASNase, podemos destacar a meia-vida plasmática: enquanto a meia-vida da PEG-ASNase é entre 5 e 7 dias, as demais possuem valores significativamente menores, sendo 1,24 dias para a de *E. coli* e 0,65 dia para a de *E. chrysanthemi* (ASSELIN, 1999). Nos Estados Unidos, PEG-ASNase é utilizada como primeira opção na linha de tratamento da LLA, enquanto que a enzima de *E. chrysanthemi*, por ser oriunda de um organismo diferente, é utilizada como segunda opção em pacientes que apresentam hipersensibilidade à enzima PEGuilada (MARINI et al., 2017). No Brasil, em razão do recente desabastecimento de todas as formas da enzima, o país registrou e passou a importar e utilizar clinicamente a PEG-ASNase para o tratamento da LLA (ANVISA, 2017).

Infelizmente, a administração de L-ASNase provoca o aparecimento de inúmeras reações adversas em pacientes acometidos com a doença, o que muitas vezes invibializa o tratamento. Reações de hipersensibilidade são comuns, especialmente em versões da enzima não PEGuiladas, e são provocadas pelo aumento na produção de anticorpos anti-ASNase, incluindo sintomas como anafilaxia, eritema, edema e urticária (PIETERS et al., 2011). Outro problema recorrente é a inativação silenciosa do biofármaco. Neste caso, pacientes não

apresentam os sintomas comuns de hipersensibilidade, mas produzem anticorpos capazes de neutralizar a ação da L-ASNase no organismo (TONG et al., 2014). Com o objetivo de introduzir uma enzima com meia-vida equiparável à PEG-ASNase e com potencial de ser utilizada como alternativa em pacientes que apresentassem hipersensibilidade à primeira linha de tratamento, uma versão PEGuilada da L-ASNase de *E. chrysanthemi* foi desenvolvida e testada recentemente. No entanto, todos os quatro pacientes envolvidos no estudo não puderam completar o tratamento, sendo que dois deles apresentaram reações severas de hipersensibilidade e um deles apresentou níveis séricos de ErA abaixo do detectável, fatores estes atribuídos à presença de anticorpos anti-PEG (RAU et al., 2018). Novas alternativas menos imunogências e com maior meia-vida plasmática são portanto necessárias.

Ademais, outros problemas relacionados à produção da proteína em si também estão presentes. Por ser uma enzima intracelular, diversas etapas de purificação são necessárias para a obtenção do produto final puro. Métodos extrativos empregados para o rompimento celular do microorganismo responsável pela expressão do biofármaco estão presentes em todos os processos industriais dos principais tipos de L-ASNase no mercado (GERVAIS et al., 2013; CHMP, 2015; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2015). A presença dessas etapas de homogeneização celular promovem por fim o encarecimento do processo de produção do biofármaco (BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009). Estratégias de produção de L-ASNase recombinante, em contrapartida, ao aumentar tanto a eficiência quanto o rendimento das etapas de purificação, podem ser capazes de baratear esses custos de produção. No entanto, formação de agregados insolúveis presentes em corpos de inclusão são comumente presentes em proteínas expressas em grandes quantidades (FAHNERT; LILIE; NEUBAUER, 2004), problema inclusive já observado na expressão da própria L-ASNase (UPADHYAY et al., 2014).

Desta forma, tanto a presença dos problemas de expressão e purificação expostos acima quanto a baixa meia-vida plasmática do medicamento e a recorrência de efeitos adversos exaltam a imprescindibilidade de se obter novas plataformas de produção biotecnológica da L-ASNase com melhor custo-benefício e que sejam capazes de produzir formas mais eficazes e menos tóxicas do medicamento.

1.1.2 O SISTEMA DE SÍNTESE PROTEICA LIVRE DE CÉLULAS COMO ALTERNATIVA

O sistema de síntese proteica de livre de células (SPLC) é uma tecnologia de produção *in vitro* de proteínas recombinantes composta basicamente por um extrato celular (ou componentes da maquinaria biológica de transcrição/tradução purificados), uma solução energética e um DNA que codifica a proteína de interesse. No caso de sistemas baseados em extratos celulares, determina-se inicialmente a linhagem celular a ser empregada e procede-se com a sua etapa de crescimento e lise celular. Do lisado celular, são obtidos todos os elementos da maquinaria de trascrição do DNA e tradução proteica, tais como aminoacil tRNA sintetases, RNA polimerases, fatores de iniciação e elongamento, ribossomos, além de chaperonas para o correto dobramento proteico. Ao conteúdo intracelular obtido após a etapa de lise celular, são adicionados mais dois tipos de componentes: DNA exógeno contendo o gene que codifica a proteína de interesse a ser expressa e uma solução energética, capaz de ativar o sistema por meio da suplementação de substratos tais como nucleotídeos, aminoácidos, substratos energéticos, cofatores e sais (Figura 1) (CARLSON et al., 2012).

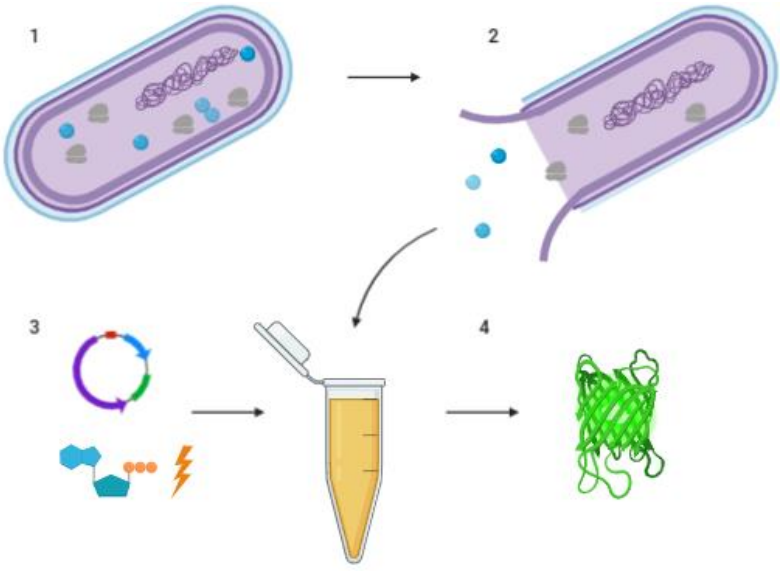


Figura 1. Representação simplificada de uma reação de SPLC. Extratos celulares são obtidos inicialmente a partir da lise de células advindas de uma linhagem específica (1) (2). Adiciona-se o extrato celular juntamente com uma solução energética e o DNA contendo o gene de interesse a ser expresso (2) (3) em uma solução e, dentro de algumas horas, a proteína recombinante de interesse é produzida (4).

Em busca de métodos mais eficazes, simples e de menor custo de síntese proteica, a plataforma de SPLC vem se tornando uma alternativa viável e crescido significativamente nos últimos anos. Um dos primeiros e mais proeminentes relatos de utilização de extratos celulares para síntese de proteínas *in vitro* foi observada em 1961 por Nirenberg e Matthaei, estudos estes que auxiliaram futuramente no desvendamento do código genético (NIRENBERG, 2004). Constatou-se que com a adição de ácido poliuridílico sintético a lisados celulares desprovidos de RNAm endógeno, ocorria uma incorporação significativa de C^{14}-L-fenilalanina durante a síntese proteica (NIRENBERG; MATTHAEI, 1961), ajudando na confirmação futura do papel da trinca de uracila (UUU) como códon necessário à síntese de fenilalanina.

Outras grandes descobertas na área de biologia molecular foram obtidas graças à utilização de sistemas *in vitro* de síntese proteica. Sistema de SPLC baseado na utilização de extratos de *E. coli* produzidos por DeVries e Zubay auxiliaram, por exemplo, na compreensão dos mecanismos regulatórios envolvidos no sistema operon *lac*. Com a adição de DNA contendo parte do gene da β-galactosidase, foi possível expressar o fragmento α da enzima que, combinado com a porção complementar da enzima expressa de forma endógena no extrato celular, foi capaz de resultar na enzima em sua forma final ativa (DEVRIES; ZUBAY, 1967). Subsequente adição do indutor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) em misturas contendo o repressor *lac* foi capaz de aumentar a síntese da proteína, enquanto que adição do repressor *lac* parcialmente purificado, inibiu a síntese do fragmento α (ZUBAY; LEDERMAN; DEVRIES, 1967).

Nos últimos anos, graças a inúmeros avanços nas técnicas utilizadas para produção de sistemas de SPLC, como a simplificação nos protocolos de obtenção dos extratos celulares e a substituição dos reagentes por produtos mais acessíveis e de menor custo, o sistema tem se popularizado e ganhado maior destaque na literatura. Soma-se a esse interesse crescente uma vasta gama de benefícios oferecidos pela técnica, dos quais incluem, mas não se limitam, aos seguintes aspectos: ambiente ‘aberto’ da reação, que viabiliza a introdução de substratos à reação de forma prática e dinâmica; rápido monitoramento da reação; direcionamento da reação à produção do produto de interesse, não havendo a necessidade por parte do sistema em desprender energia para a manutentação das vias metabólicas necessárias ao crescimento

celular; produção de proteínas tóxicas; diminuição do tempo necessário para a síntese e purificação do produto; portabilidade e triagem de um número elevado de mutantes em estudos de evolução dirigida, por exemplo (PEREZ; STARK; JEWETT, 2016).

A seguir serão detalhados cada um dos componentes essenciais para o desenvolvimento de um sistema de SPLC (i.e extrato celular, solução energética e DNA), indicando suas formas de obtenção, usos mais frequentes, além dos benefícios e desvantagens de cada um dos componentes.

1.1.2.1 Material Genético

Uma das grandes vantagens de sistemas de SPLC é a possibilidade de adição do material genético diretamente na reação. Logo, deixa de ser necessário etapas de transformação celular, como choque térmico e eletroporação. No entanto, é importante destacar que a construção do material genético contendo a sequência genética de interesse é uma das etapas mais importantes durante o desenvolvimento de uma plataforma de SPLC.

Nesta tecnologia, tanto plasmídeos quanto DNA lineares produzidos por reações em cadeia de polimerização de DNA (PCR) podem ser utilizados como molde na reação *in vitro* (WHITTAKER, 2013). No caso dos plasmídeos, é importante que o material seja purificado adequadamente, de forma que a presença de contaminantes que possam impactar negativamenta a reação (como RNAses por exemplo) não estejam presentes. Além disso, o plasmídeo precisa estar em concentração adequada, de modo que haja quantidade suficiente de molde durante todo o processo (KUMAR; CHERNAYA, 2009). Alternativamente, moldes de DNA obtidos a partir de PCR podem ser utlizados. Neste caso, embora seja mais fácil obter quantidades maiores de material genético, moldes de DNA lineares são mais susceptíveis à ação de nucleases presentes nos extratos celulares, diminuindo com isso o rendimento da reação. Por conta disso, estratégias de melhorias de rendimento de síntese proteica são necessárias nestes tipos de sistemas. Uma das formas mais usuais de se contornar o problema é a partir da introdução de inibidores de exonucleases, sendo a proteína GamS do bacteriófago λ a mais comum (SCHINN et al., 2016).

Em ambos os casos, o DNA precisa conter todas as partes genéticas fundamentais para os processos de transcrição e tradução. Promotores, sítios de ligação ribossômica e terminadores de transcrição são importantes elementos regulatórios, imprescindíveis na grande maioria dos sistemas de expressão. Dentre os promotores mais comumente usados, podemos destacar o promotor T7 para extratos originários de bactérias *E. coli* que, sob a ação da T7 RNA polimerase, capacita o sistema a transcrever o material genético com alta fidelidade, rendimento e especificidade (SOUSA; MUKHERJEE, 2003); vetores comerciais como o pET (Novagen) e o pIVEX (Roche Biosciences) podem facilmente ser utilizados para esta finalidade (SCHWARZ et al., 2007). No caso de sistemas de expressão baseados em extratos celulares de eucariotos, sítios internos de entrada de ribossomos (IRES) são comumente empregados com a finalidade de aumentar o rendimento do processo de tradução (CARLSON et al., 2012).

1.1.2.2 Extratos Celulares

Diferentes tipos de extratos celulares podem ser utilizados em sistemas de SPLC. Dentre os mais frequentes, podemos enumerar os seguintes organismos/células: *E. coli*, reticulócitos de coelhos, gérmen de trigo, células de inseto, células de ovário de hamster chinês (CHO), *Saccharomyces cerevisiae* e células de tabaco. A escolha do extrato deve levar em conta as vantagens e desvantagens oferecidas por cada tipo de extrato, o que por sua vez está instrinsicamente relacionada às características e usos da biomolécula de interesse a ser expressa por esse sistema (CARLSON et al., 2012; PEREZ; STARK; JEWETT, 2016).

Extratos de *E. coli* são os mais frequentes. O baixo custo e a facilidade de preparação dos extratos estão entre os principais motivos da sua popularidade. Técnicas de fácil acesso e baixo custo como sonicação (SHRESTHA; HOLLAND; BUNDY, 2012) (KWON; JEWETT, 2015), rompimento celular por grânulos (SUN et al., 2013) e choque osmótico (FUJIWARA; DOI, 2016) podem ser usados para a obtenção do lisado celular, sem resultar em grande comprometimento no rendimento final da reação, apesar da utilização de homogeneizadores em alta pressão ser recorrente (LIU; ZAWADA; SWARTZ, 2005) (ZAWADA et al., 2011) (GARAMELLA et al., 2016).

Além disso, inúmeros trabalhos de otimização metabólica e preparação do extrato celular permitiram que os rendimentos de síntese proteica aumentassem significativamente no decorrer dos anos. Por exemplo, foi observado que a depleção excessiva de fosfoenolpiruvato e cisteína, dois componentes essenciais para a síntese proteica, era causada pela ação de fosfatases no meio reacional. Logo, a adição de glicose e de altas concentrações de cisteína no meio foram capazes de inibir a ação dessas mesmas fostases e aumentar em 70% o rendimento da expressão de proteínas recombinantes, atingindo valores entre 0,18 e 0,3 mg/mL da proteina alvo (KIM; CHOI, 2000). Mais tarde, síntese de 2,3 mg/mL da proteína verde fluorescente (GFP) foi obtida em extratos da linhagem de *E. coli* BL21 Rosetta2 produzidos utilizando o método convencional de lise por alta pressão (CASCHERA; NOIREAUX, 2014), enquanto que quantidades superiores a 6 mg/mL de GFP foram atingidas em sistemas de expressão do tipo semi-contínuo (GARAMELLA et al., 2016).

Uma desvantagem da utilização de extratos de *E. coli* decorre da incapacidade da célula em realizar modificações pós-traducionais, principalmente no que se refere à glicosilação de proteínas. No entanto, novos sistemas de SPLC têm sido produzidos para contornar este problema por meio da implementação de uma maquinaria de glicosilação bacteriana semelhante a observada em organismos mais complexos. De fato, Jaroentomeechai et al. desenvolveram um sistema de SPLC capaz de glicosilar proteínas recombinantes; para este fim, dois plasmídeos contendo cinco enzimas da bactéria *Campylobacter jejuni* responsáveis pela adição sucessiva de glicanos, e uma oligosiltransferase responsável pela transferência do glicano sintetizado à proteína expressa e oriunda do mesmo organismo, permitiram a expressão de proteínas de interesse com este novo padrão de glicosilação (JAROENTOMEECHAI et al., 2018). Novas abordagens semelhantes foram capazes de ampliar a diversidade do padrão de glicosilação proteica observados neste mesmo tipo de extrato bacteriano (KIGHTLINGER et al., 2019).

A utilização de células eucarióticas como CHO, gérmen de trigo e tabaco possuem a grande vantagem de permitir a produção de proteínas mais complexas, uma vez que são capazes de realizar modificações pós-traducionais, permitindo a expressão de proteínas citosólicas, de membrana e glicosiladas. A glicosilação da eritropoietina (EPO), por exemplo, é imprescindível para a manutenção de sua atividade biológica, sendo necessário, portanto, a

utilização deste tipo de extrato (BRÖDEL; WÜSTENHAGEN; KUBICK, 2014). Especialmente no caso da utilização das células de mamífero, o alto custo e laboroso processo de obtenção de extrato, associado ao baixo rendimento de síntese proteica, torna a utilização destas linhagens mais restritiva em relação aos extratos de *E. coli* (PEREZ; STARK; JEWETT, 2016).

1.1.2.3 Soluções Energéticas

A suplementação de componentes energéticos e outros substratos necessários para a síntese proteica é de extrema importância em uma reação de SPLC. A solução energética, juntamente com o extrato celular, devem ser capazes de prover substratos às etapas de transcrição do DNA, de tradução proteica, além de processos de modificações pós-traducionais (DOPP; TAMIEV; REUEL, 2019). Será enfatizado a seguir os principais avanços no desenvolvimento de soluções energéticas que permitiram a popularização da tecnologia de SPLC utilizando extratos de *E. coli*, que foram usados em nosso estudo.

Um dos primeiros grandes avanços foi obtido em 1996 por Kim et al, que, inspirados nos trabalhos iniciais de Pratt et al (PRATT, 1984), concluíram que a adição de concentrações otimizadas de fosfoenolpiruvato (PEP) e polietilenoglicol (PEG) e um aumento na disponilidade de aminoácidos na reação eram capazes de aumentar o rendimento da síntese de cloranfenicol acetiltransferase (CAT) para 0,4 mg/mL (KIM et al., 1996). Neste caso, PEP foi usado como fonte secundária de ATP onde, por meio da adição da enzima piruvato quinase, as ligações de fosfato da molécula de PEP poderiam ser então transferidas às moléculas de ADP, que por sua vez, seriam recicladas e reutilizadas como fonte de energia - ATP.

No entanto, constatou-se que a rápida degradação de PEP (assim como outras fontes secundárias como acetil fosfato e creatina fosfato (CP)), além da rápida acumulação de fosfato no meio, era responsável pela curta e insuficiente duração de síntese proteica nestes sistemas. Por conta disso, Kim e Swartz desenvolveram uma nova metodologia onde, por meio da adição de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD) e piruvato na solução energética, era possível promover a regeneração de ATP sem necessidade de adição de PEP, e consequentemente, de piruvato quinase (KIM; SWARTZ, 2001). Neste novo sistema, haveria

no extrato as enzimas necessárias para conversão de piruvato à acetil-CoA e em seguida, acetil fosfato e acetato, com geração de ATP. Além disso, os autores verificaram que o uso de glicose-6-fosfato (G6P) também poderia servir como fonte secundária de ATP, uma vez que tanto G6P quanto piruvato são intermediários da via glicolítica e, por isso, são capazes de regenerar ATP por esta via. Outros incrementos como a adição de oxalato de sódio e de coenzima A (CoA) foram capazes de melhorar o rendimento da reação.

Em 2004, novas alterações foram feitas de modo a tentar emular da melhor maneira possível as condições bioquímicas encontradas naturalmente no ambiente citoplasmático bacteriano. Eliminação de reagentes não encontrados naturalmente no citoplasma como PEG, por exemplo, adição de policátions envolvidos na manutenção celular, como putrescina e espermidina, e finalmente a adição de piruvato como fonte secundária, permitiram com que este novo sistema pudesse produzir 0,7 mg/mL de CAT, mantivesse o pH e não acumulasse fosfato no meio, o que inibiria a síntese proteica (JEWETT; SWARTZ, 2004).

Além de PEP, outros compostos fosforilados como CP e ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) foram estudados como fontes secundárias de energia. Em 2006, o uso de CP demonstrou ser altamente eficiente na síntese proteica, sendo capaz de produzir concentrações maiores que 1 mg/mL de proteínas por reação, mediante suplementação adequada de magnésio (KIM; KIM; CHOI, 2006). Por outro lado, 3-PGA também se mostrou bastante eficiente, devido principalmente à sua maior estabilidade em relação às demais moléculas (SITARAMAN et al., 2004).

Os sistemas acima apresentados serviram como ponto de partida para futuros estudos de otimização de soluções energéticas, com o intuito de diminuir os custos relacionados aos produtos e aumentar o rendimento. Essas informações serão detalhadas adiante.

1.1.3 OS CUSTOS DA TECNOLOGIA

Os recentes avanços nos protocolos de produção de extratos celulares, além da incorporação e otimização de novas soluções energéticas para reações de SPLC, vieram acompanhados de uma diminuição significativa dos custos desta tecnologia no decorrer dos anos. Esta diminuição é interessante por diversos motivos. Primeiramente, porque democratiza o acesso à tecnologia a vários centros de pesquisa, contribuindo com o avanço da

área e a fácil implementação em diferentes projetos de pesquisa. Segundo, porque implica na redução dos custos envolvidos no processo de produção dos produtos biotecnológicos, tornando-se uma opção viável para a comercialização de produtos obtidos por essa plataforma.

Em 2001, Shimizu et al. desenvolveram um sistema baseado majoritariamente no uso de proteínas recombinantes purificadas. A tecnologia incluía, entre outros componentes, proteínas envolvidas no processo de tradução (fatores de iniciação, elongamento e término), tRNA sintetases, metionil-tRNA transformilase, T7 RNA polimerase e ribossomos, sendo capaz de sintetizar dihidrofolato redutase (DHFR) (SHIMIZU et al., 2001). Embora relativamente eficiente, o custo por mL de reação utilizando este sistema ainda era alto: U$ 790,00/mL em kits comerciais capazes de expressar por volta de 0,2 mg/mL de proteína recombinante (SUN et al., 2013). Foi somente a partir da otimização de extratos celulares que os sistemas de SPLC passaram a ganhar maior destaque, substituindo desta forma antigos sistemas compostos por produtos purificados e de alto custo.

Um grande avanço foi observado com a substituição do uso de nucleotídeos trifosfatos (NTPs) para nucleotídeos monofosfatos (NMPs) e de componentes energéticos como PEP e CP para glicose e glutamato, por exemplo. Em relação a sistemas baseados em PEP e NTPs, Calhoun e Swartz verificaram que seria possível mantê-los com níveis energéticos aceitáveis e a um custo 75% mais baixo se tais componentes fossem substituídos por glicose e NMPs (os quais seriam reconstituídos para NTPs posteriormente durante a reação). Com isso, se considerados os valores relativos aos reagentes e excluindo aqueles envolvidos na preparação do extrato, do plasmídeo e da purificação de T7 RNA polimerase, os valores passariam de U$ 2,45/mL para apenas U$ 0,58/mL, sendo capaz de sintetizar 0,66 mg/mL de CAT (CALHOUN; SWARTZ, 2008).

A possibilidade de utilização de substratos não-fosforilados foi um importante passo para a diminuição dos custos da reação. Em 2008, Jewett et al. verificaram que complexos processos metabólicos (incluindo fosforilação oxidativa) poderiam ser co-ativados em uma reação de SPLC com a simples utilização de glutamato como fonte energética. Como resultado, aproximadamente 0,62 mg/mL de CAT pôde ser sintetizada a um custo de apenas

U$ 0,004/mL de reação (custos relativos à produção do extrato e à obtençãodo DNA não foram considerados) (JEWETT et al., 2008).

Cai et al. notaram que diversos componentes da solução energética poderiam ser eliminados sem que houvesse um comprometimento no rendimento final da produção de Trastuzumab (anticorpo utilizado no tratamento do câncer de mama). Ao dobrar a concentração de glutamato no meio e reduzir a zero as concentrações de piruvato, CoA, NAD, tRNA, ácido folínico, putrescina e glutamato de amônio, o custo do sistema foi reduzido significativamente, atingindo um valor de U$ 0,04/mL de reação (CAI et al., 2015). Este feito foi um importante passo para a utilização da tecnologia de SPLC para a produção de biofármacos.

Além da simplificação dos reagentes propriamente dita, outras abordagens de engenharia genética e até mesmo a busca por novas plataformas de expressão proteica (i.e. novos organismos) têm favorecido o aumento do rendimento de síntese de proteínas recombinantes em sistemas de SPLC. Um exemplo recente é capacidade de utilização de extratos celulares da bactéria *Vibrio natriegens*, organismo celular com o tempo de duplicação mais rápido já conhecido (< 10 min), como nova plataforma de SPLC (WIEGAND et al., 2018). Estudos de otimização deste sistema demonstraram sua capacidade em sintetizar até 1,6 mg /mL de GFP, sendo comparável a valores obtidos por extratos de *E. coli* (DES SOYE et al., 2018).

Por fim, o aumento no rendimento de síntese proteica observada ao longo dos anos, aliado à simplificação dos processos de obtenção dos extratos celulares e da preparação de soluções energéticas, tem impactado favoravelmente nos custos da tecnologia de SPLC, permitindo sua popularizção e consequente utilização para os mais variados fins.

1.1.4 APLICAÇÕES DA TECNOLOGIA DE SPLC

Recentes avanços na tecnologia de SPLC, como aumento da produtividade, redução dos custos e escalabilidade, tem permitido que esta plataforma pudesse ser usada para as mais diversas finalidades (CARLSON et al., 2012). Dentre esses usos podemos destacar: produção de biofármacos em pequena (PARDEE et al., 2016b) e larga escala (ZAWADA et al., 2011), desenvolvimento e produção de vacinas (LU; WELSH; SWARTZ, 2014; SHRESTHA;

SMITH; BUNDY, 2014) , testes de diagnóstico portáteis (PARDEE et al., 2016a), síntese de proteínas citotóxicas (SALEHI et al., 2016) e de proteínas contendo aminoácidos não canônicos (MARTIN et al., 2018), além de estudos de triagem de alta produtividade (HTS).

1.1.4.1 Testes de Diagnóstico Portáteis e Biosensores

A facilidade de manipulação dos sistemas de SPLC permitiu que novas plataformas mais eficientes e portáteis de diagnóstico pudessem ser desenvolvidas. De forma geral, muitos processos e equipamentos de diagnósticos são caros e demandam equipamentos especializados. Por outro lado, a utlização de sistemas de SPLC em testes de diagnósticos e biosensores permitiria que novas tecnologias mais baratas e portáteis pudessem ser desenvolvidas e que resultados mais rápidos e robustos pudessem ser atingidos (SOLTANI et al., 2018).

Um importante exemplo de utilização desta tecnologia foi a produção de testes de detecção portáteis dos vírus Ebola e Zika (PARDEE et al., 2014) (PARDEE et al., 2016a). Em ambos os casos, foram implementados sistemas de detecção colorimétricos de RNA viral baseados na atividade da enzima β-galactosidase. A enzima seria expressa nesse modelo de SPLC apenas na presença dos RNA virais, sendo então capaz de clivar o seu respectivo substrato e produzir o produto de coloração roxa, indicando a presença do vírus (PARDEE et al., 2014). Uma vez que o sistema pode ser desidratado e rehidratado apenas no momento do uso, torna-se viável a distribuição da tecnologia para áreas mais remotas e menos desenvolvidas do ponto de vista tecnológico.

Detecção de outros biomarcadores como moléculas de *quorum sensing* bacteriano permitiram a detecção de amostras de escarro humano infectadas com *Pseudomonas aeruginosa*, normalmente presente em pacientes que sofrem de fibrose cística. A detecção se baseou na expressão da proteína GFP que, ao emitir fluorescência, tornaria possível quantificar a concentração da biomolécula de interesse presente na amostra (WEN et al., 2017). Takahashi et al. mostraram também ser possível detectar mais de uma linhagem bacteriana ao mesmo tempo, ao desenvolverem biosensores capazes de detectar RNAs mensageiros de bactérias da microbiota intestinal. Desta forma, seria possível detectar, por

exemplo, infecções por *Clostridium diffile,* substituindo outros métodos de detecção usuais como RT-qPCR (TAKAHASHI et al., 2018).

1.1.4.2 Estudos de Triagem de Alta Produtividade (HTS)

Diversas características do modelo de SPLC permitiram que esta tecnologia se tornasse uma opção viável para estudos de HTS. Primeiramente, uma vez que o material genético é adicionado diretamente no meio reacional, extensivas etapas de clonagem são dispensáveis, permitindo com isso que diversas sequências possam ser estudadas ao mesmo tempo. Além disso, dada a diminuição dos custos da tecnologia no decorrer dos anos e a viabilidade de minituarização das reações (DAMIATI et al., 2018), a realização de múltiplas reações ao mesmo tempo tornou-se possível (CARLSON et al., 2012).

Tanto bibliotecas apresentadas por ribossomos, quanto bibliotecas apresentadas por RNAs mensageiros têm sido beneficiadas com os recentes avanços nos processos de obtenção de sistemas de SPLC. Por exemplo, síntese, triagem e purificação de variantes do anticorpo Trastuzumab têm sido feitos a partir de sistemas de SPLC baseados em extratos de *E. coli*, resultando na síntese de novos anticorpos capazes de se ligar ao seu antígeno alvo (STAFFORD et al., 2014). Extratos de gérmen de trigo também têm sido otimizados com êxito, viabilizando a síntese de 27 diferentes genes de *Arabidopsis thaliana* e genes humanos a partir de uma biblioteca de DNAs gerada por PCR (ENDO; SAWASAKI, 2004).

Por fim, estudos de evolução dirigida permitiram a triagem de enzimas com características melhoradas. Stapleton e Swartz, por exemplo, produziram uma variante da enzima [FeFe] hidrogenase com atividade específica quatro vezes superior à enzima nativa, após triagem de aproximadamente 30.000 mutantes produzidas por PCR propensa a erro (epPCR) (STAPLETON; SWARTZ, 2010). Além disso, Angenendt et al. foram capazes de expressar e detectar as proteínas GFP e β-galactosidase utilizando SPLC em volumes nanométricos, cujos valores variavam entre 0,1 e 1 µL. Estes resultados demonstraram o potential da plataforma como ferramenta para a rápida triagem de novos biofármacos e enzimas de interesse biotecnológico (ANGENENDT et al., 2004).

1.1.4.3 Produção de Biofármacos

Tradicionalmente, a produção de proteínas recombinantes para uso terapêutico requer o uso de sistemas celulares convencionais de expressão, tais como bactérias (*E. coli*), leveduras (*S. cerevisiae*), e células de mamíferos (principalmente, CHO). Neste atual modelo, a produção é centralizada em plantas biotecnológicas de alta complexidade e, devido à alta sensibilidade da grande maioria dos biológicos a variações de temperatura, sofisticados sistemas de distribuição e cadeias de frio são imprescindíveis. O resultado deste modelo é um aumento no custo e no tempo necessário para a produção de biofármacos (OGONAH; POLIZZI; BRACEWELL, 2017).

A implementação de um modelo de síntese livre de células para produção de novos produtos biotecnológicos de interesse clínico apresentaria diversos benefícios, tanto no que tange o desenvolvimento de novas biomoléculas com características biológicas melhoradas, quanto no aumento da eficiência de síntese, purificação e distribuição do produto.

Pardee et al. desenvolveram uma plataforma portátil de produção de biofármacos e outras biomoléculas de interesse clínico sob demanda (PARDEE et al., 2016b). O sistema consistiu na preparação e liofilização de extratos celulares de *E. coli* juntamente com o DNA contendo o gene de interesse. A partir da simples adição de água ao sistema, foram produzidos e caracterizados peptídeos antimicrobianos e vacinas. Diversos peptídeos antimicrobianos foram facilmente purificados tanto por cromatografia de afinidade quanto por gel filtração e tiveram sua antividade antimicrobiana confirmada. Além destes, antígenos da toxina diftérica (TD) foram expressos com sucesso, purificados e foram capazes de estimular a produção de anticorpos anti-TD quando injetados em camundongos (PARDEE et al., 2016b).

Em outro estudo, o fator estimulador de colônias de granulócitos (GM-CSF), a EPO e a TD foram produzidos em um sistema portátil e automatizado de SPLC, o qual continha extratos celulares liofilizados de CHO acoplado a um sistema de purificação por cromatografia de afinidade. Boas práticas de frabricação foram seguidas e testes comparativos de atividade biológica dos biofármacos produzidos neste sistema *in vitro* em relação a

métodos convencionais de produção por células confirmaram similaridade estrutural e funcional entre os produtos obtidos (ADIGA et al., 2018).

Além da portabilidade proporcionada tanto pelo tamanho reduzido de grande parte dos sistemas de SPLC, quanto pela possibilidade de liofilização dos seus respectivos componentes, a tecnologia demonstrou também grande potencial em relação à escabilidade na produção. O exemplo mais proeminente é a produção da proteína GM-CSF biologicamente ativa a partir de uma reação de SPLC de 100 L (ZAWADA et al., 2011). A citocina foi produzida a partir de extratos de *E. coli* produzidos em fermentadores e com concentrações proteicas próximas de 700 mg/L. Concentrações similares foram obtidas em reações de menor volume (250 µL, 300 mL e 4 L), demonstrando linearidade na escabilidade da produção deste biofármaco. De modo semelhante, a síntese do anticorpo Trastuzumab foi obtido em reações de SPLC de diferentes volumes, variando entre 10 µL até 5 L e com rendimentos acima de 100 mg/L (YIN et al., 2012).

Outros importantes avanços na área de SPLC em relação à produção de biofármacos foram obtidos recentemente. Sullivan et al. desenvolveram um sistema capaz de produzir EPO e GM-CSF a partir de extratos celulares de levedura (*S. cerevisiae)* e de bactéria (*E. coli*), respectivamente (SULLIVAN et al., 2016). Assim como no trabalho desenvolvido por Adiga et al, o grupo foi capaz de sintetizar e purificar estes biofármacos utilizando um único sistema, simplificando desta forma os processos necessários em relação aos modelos tradicionais de expressão em células e biorreatores. Para purificação, foram utlizadas as técnicas de cromatografia de afinidade, troca iônica e exclusão molecular (SULLIVAN et al., 2016).

1.1.4.4 Outros Usos

A tecnologia de SPLC pode ser extendida a diversos outros usos. Graças à tecnologia, síntese de proteínas mais complexas, as quais seriam inviáveis utilizando modelos convencionais de expressão celular, passou a se tornar possível. Um exemplo claro é a capacidade de expressão de proteínas de membrana, as quais costumam ser difíceis em linhagens celulares devido à sua toxicidade e dificuldade de solubilização (TINAFAR; JAENES; PARDEE, 2019). Em sistemas de SPLC, essas proteínas podem ser estabilizadas *in*

vitro adicionando reagentes como surfactantes e lipossomos, prevenindo com isso a agregação dessas proteínas durante a reação (PEREZ; STARK; JEWETT, 2016). Outras proteinas naturalmente citotóxicas como a onconase, quando expressas em *E. coli*, resultam em corpos de inclusão, requerendo extensivas etapas de redobramento proteico. Em sistemas de SPLC, a mesma proteína pôde ser expressa na sua forma ativa e solúvel (SALEHI et al., 2016).

Proteínas compostas por múltiplas subunidades também puderam ser sintetizadas. Bundy et al. foram capazes de expressar partículas virais de bacteriófagos e de hepatite B em um sistema de expressão baseado em extratos de *E. coli* com rendimentos superiores e atividade biológica comparável às mesmas partículas produzidas *in vivo* (BUNDY; FRANCISZKOWICZ; SWARTZ, 2008). Surpreendemente, a expressão do bacteriófago T4, vírus composto estruturalmente por 1.500 proteínas originadas de aproximadamente 50 diferentes genes também foi possível. Os pesquisadores utilizaram como molde genético o próprio genoma viral e sintetizaram por volta de 10^9 bacteriófagos por mL de reação (RUSTAD et al., 2018).

Por fim, rotas biossintéticas contendo uma série de enzimas capazes de produzir um produto final de interesse industrial ou clínico podem ser implementadas em modelos *in vitro* de sintese proteica. Exemplos incluem o desenvolvimento de um sistema composto por 27 enzimas capazes de sintetizar terpenos (classe de produtos naturais normalmente encontrada em fragrâncias, vitaminas e biocombustíveis) a partir de glicose (KORMAN; OPGENORTH; BOWIE, 2017); além de um sistema modular de construção de vias de glicosilação composto por glicosiltransferases sintetizadas individualmente (KIGHTLINGER et al., 2019). Similarmente, a caracterização de diferentes circuitos genéticos, contendo diferentes tipos de sequências de DNAs, é enormemente facilitada em plataformas de SPLC. O maior controle de diferentes parâmetros bioquímicos e biofísicos, aliado à rapidez de expressão proteica nesses sistemas, fazem com que esta tecnologia se torne uma poderosa ferramenta para o estudo de complexas interações genéticas (TAKAHASHI et al., 2015).

1.1.5 PRODUÇÃO DA ErA EM SISTEMAS DE SÍNTESE PROTEICA LIVRE DE CÉLULAS

Em artigos de pesquisa publicados recentemente, demonstrou-se a viabilidade de expressão da enzima ErA em sistemas de SPLC (WILDING et al., 2019a, 2019b; HUNT et al., 2020). Extratos oriundos de duas linhagens diferentes de *E. coli*, tanto BL21(DE3) quanto ClearColi® BL21(DE3), foram capazes de sintetizar quantidades próximas de 1 mg/mL de enzima por reação (WILDING et al., 2019a). Rendimentos próximos foram alcançados mesmo com a liofilização prévia de extratos de ClearColi® BL21(DE3), permitindo a estocagem desses sistemas em temperatura ambiente e por períodos mais longos (WILDING et al., 2019b). Importante destacar que a linhagem de *E. coli* ClearColi® é particulamente interessante no caso da L-ASNase pois, pelo fato desta linhagem não apresentar LPS em sua parede celular, a etapa de purificação de endotoxinas durante o processo de produção da L-ASNase torna-se desnecessária, diminuindo com isto os custos relativos à sua produção.

Nestes estudos, apesar da enzima ter sido sintetizada e purificada por cromatografia de afinidade (construção da ErA com cauda de histidina na porção C-terminal foi empregada), a atividade específica da ErA foi significativamente baixa (WILDING et al., 2019a). Verificou-se que a expressão da mesma enzima, no entanto sem cauda de histidina, foi capaz de resgatar a sua atividade biológica para valores próximos aos encontrados na literatura (de ~1 U/mL à ~350 U/mL), mesmo que este aumento de atividade tenha impactado negativamente no rendimento médio final da reação (de ~0,7 mg/mL à 0,15 mg/mL). Devido ao fato da enzima consumir asparagina do meio, esta diminuição de rendimento é possivelmente provocada pela própria depleção deste aminoácido, sendo necessário otimizações nas condições reacionais. De fato, constatou-se que, com a suplementação de aspartato no meio reacional, é possível aumentar a concentração de ErA recombinante em até 46%, fato este que se deve basicamente à suplementação abundante de substrato à enzima asparagina sintetase (ASNS) (que é capaz de produzir asparagina) e à inibição da atividade asparaginásica da própria ErA, sendo sintetizada em decorrência do excesso de aspartato (HUNT et al., 2020) (Figura 2).

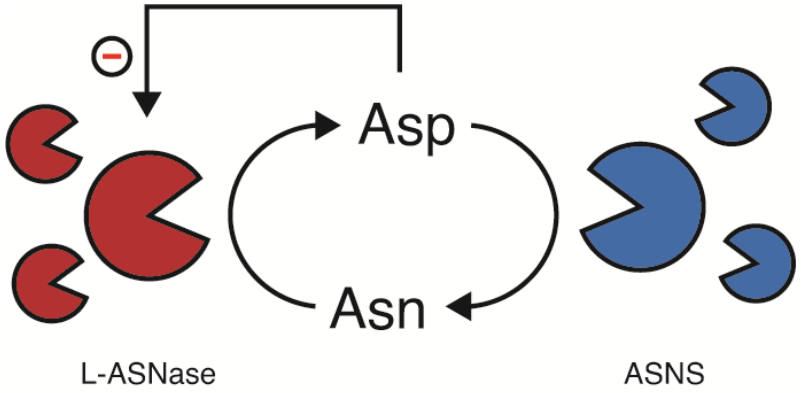


Figura 2. Mecanismo de reação das enzimas L-ASNase e ASNS. Neste diagrama, podemos observar que a enzima L-ASNase é capaz de produzir aspartato a partir de asparagina. O aspartato, por sua vez, pode ser utilizado para a síntese de asparagina, reação esta catalisada pela enzima ASNS. Excesso de aspartato impede que haja depleção de asparagina no meio e inibe, ao mesmo tempo, a atividade enzimática da L-ASNase. Outros componentes envolvidos na reação não estão representados.

Neste mesmo trabalho, constatou-se que é possível utilizar a plataforma de SPLC não apenas como tecnologia de síntese proteica sob demanda, mas também como uma plataforma para quantificação da atividade enzimática da própria ErA. Diferentemente dos ensaios tradicionais de quantificação da atividade da L-ASNase, onde utiliza-se reagentes químicos para detecção dos produtos oriundos da reação enzimática, com a plataforma de SPLC, há a possibilidade de calcular indiretamente a atividade da enzima por meio da quantificação da fluorescência da proteína GFP, cuja síntese *in vitro*, neste trabalho, foi inversamente proporcional à quantidade de enzima presente (HUNT et al., 2020).

1.1.6 EXPANDINDO O ALCANCE DA TECNOLOGIA

Inúmeros benefícios poderiam ser alcançados por meio da expressão da ErA em sistemas de SPLC. Conforme já mencionado por trabalhos recentes com esta enzima, a expressão *in vitro* da ErA permitiria: a expressão para uso clínico em plataformas livre de endotoxinas (WILDING et al., 2019a); a produção sob demanda e para regiões remotas a partir do uso de extratos liofilizados (WILDING et al., 2019b); e o desenvolvimento de tecnologias para quantificação da atividade sérica da enzima (HUNT et al., 2020).

Em decorrência destes recentes trabalhos de expressão da ErA em sistemas de SPLC, decidiu-se neste projeto não apenas estudar e otimizar novas plataformas de expressão *in vitro* da enzima, mas também de avaliar novas oportunidades de aprimoramento do processo de produção e do desenvolvimento de novas variantes da ErA, as quais se beneficiariam com a expressão da enzima em sistemas de SPLC. Tais aprimoramentos serão trabalhados a partir de técnicas de **bioconjugação** da enzima a bacteriófagos, o que permitirá o desenvolvimento de novas tecnologias de triagem e detecção de variantes da ErA e facilitará, ao mesmo tempo, a criação de métodos mais rápidos e eficientes de obtenção da enzima na sua forma pura a partir de lisados celulares. A importância tanto do processo de purificação da ErA quanto do processo de bioconjugação serão explicados com mais detalhes a seguir.

1.1.6.1 Purificação

Quando analisamos os atuais processos utilizados para a purificação da ErA, verificamos que um número significante de etapas são utilizadas para a obtenção do produto final puro para utilização clínica. Além das etapas de cultivo e lise celular (esta última requerida, uma vez que a enzima não é exportada para o meio extracelular), são utilizadas também os métodos de precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de troca catiônica, e cromatograia de troca aniônica (GERVAIS et al., 2013). Estas etapas, especialmente as relacionadas às de lise celular, acabam promovendo o encarecimento do processo de produção do biofármaco (BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009), impactando consequentemente nos custos finais do tratamento.

A produção da ErA em sistemas de SPLC simplificaria este processo, não somente por reduzir o tempo de expressão do biofármaco, mas também ao permitir que o biofármaco pudesse ser purificado diretamento do meio reacional, sem necessidade de centrifugação e rompimento celular. Murthy et al., por exemplo, foram capazes de purificar 51 proteínas recombinantes produzidas em sistemas de SPLC com apenas uma etapa de cromatografia por afinidade e a partir de reações de apenas 50 µL de volume (MURTHY et al., 2004). Proteínas de uso clínico por sua vez, como EPO e GM-CSF, foram expressas e purificadas com sucesso a partir de diferentes sistemas de SPLC e em menos de 24 hrs (SULLIVAN et al., 2016).

Desenvolver novas técnicas de purificação da ErA, as quais seriam beneficiadas com a síntese *in vitro* da proteína, poderia diminuir ainda mais o tempo necessário para a obtenção do biofármaco. Estratégias como bioconjugação seriam de especial interesse.

1.1.6.2 Bioconjugação

Implementar estratégias de bioconjugação em sistemas de SPLC amplificaria significativamente as aplicações da tecnologia atualmente. Embora poucos estudos de integração de expressão de proteinas *in vitro* e formação de bioconjugados tenham sido pubicados na literatura até o momento, essa estratégia poderia facilitar enormente estudos de engenharia e purificação proteica. No caso de estudos de evolução dirigida, seria possível, por exemplo, selecionar proteínas mutantes de interesse a partir de sua conjugação à proteínas repórteres, como a GFP (RICHARDSON et al., 2018), ou mesmo a moléculas de DNA (STEIN et al., 2007), bastando sequenciar o bioconjugado para que se conheça o mutante em questão. Por outro lado, seria igualmente possível ligar a proteína de interesse a outras biomoléculas mais fáceis de serem purificadas, facilitando com isso a etapa de purificação.

Em 2010, Bundy e Swartz foram capazes de demonstrar a conjugação de duas proteínas heterólogas mediante a incorporação de aminoácidos não naturais à sua estrutura. A incorporação destes aminoácidos só foi possível graças à expressão dessas proteínas em um sistema de SPLC, uma vez que estes aminoácidos possuem baixa solubilidade e portanto seriam pouco permeáveis à parede / membrana celulares bacteriana se utilizadas *in vivo*. Os autores conseguiram incorporar o aminoácido p-propargiloxifenilalanina (pPa) a uma das proteínas e o aminoácido p-azido-L-fenilalina (pAz) à proteína repórter GFP (BUNDY; SWARTZ, 2010). Pelo fato do grupo alquil do aminoácido pPa ser capaz de reagir com o grupo azido do aminoácido pAz (mediante adição de cobre no meio), seria possível formar um conjugado entre as duas proteínas (Figura 3).

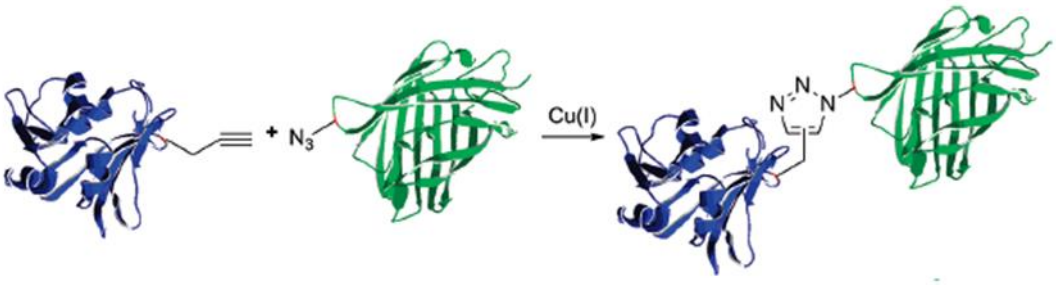


Figura 3. Reação de conjugação entre duas proteínas contendo aminoácidos reativos não naturais em sua estrutura. Adaptado de Bundy e Swartz (2010).

Alem disso, a conjugação de proteínas a DNAs seria particularmente interessante, pois permitiria correlacionar o fenótipo observado de uma proteína mutante com o genótipo inscrito na sua sequência genética fusionada. Stein et al., por exemplo, desenvolveram um método no qual proteínas de interesse fusionadas com a enzima O^6-alquilguanina-DNA alquiltransferase (AGT) foram ligadas covalentemente ao seu próprio DNA codificador e expressas em um sistema de SPLC. A mistura contendo uma biblioteca de mutantes destes bioconjugados foi então adicionada a grânulos contendo o ligante da respectiva proteína de interesse e aqueles com maior afinidade ao ligante puderam então ser selecionadas e amplificadas por PCR (STEIN et al., 2007). Este método foi usado como alternativa ao tradicional método de apresentação em fagos (do inglês *phage display*), onde bacteriófagos são capazes de expressar e apresentar diversos peptídeos/proteínas de interesse em sua estrutura, sendo muito usado para o desenvolvimento de novos anticorpos com alta afinidade por seu antígeno e maturação da afinidade de anticorpos humanizados (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002). Em ambos os casos, a atividade biológica de uma proteína de interesse pôde ser correlacionada ao material genético nela presente, seja a um DNA ligado covalentemente a proteína ou ao DNA pertencente ao genoma do bacteriófago.

Como já mencionado, a formação de bioconjugados também poderia favorecer os processos de purificação de proteínas recombinantes produzidas *in vitro*. Uma importante ferramenta de bioconjugação foi o sistema *SpyCatcher*/*SpyTag* desenvolvida em 2012 por Zakeri et al. A princípio, um domínio proteico originado da proteína ligadora de fibronectina de *Streptococcus pyogenes* foi divido em duas partes: *SpyCatcher* (proteína de massa molecular de 15 kDa) e *SpyTag* (peptídeo composto por 13 aminoácidos). O que se verificou

em seguida foi que ambas as partes, após a separação, eram capazes de se ligar novamente por meio da criação de uma ligação isopeptídica espontânea entre ambas (ZAKERI et al., 2012) (Figura 4). Ao expressar proteínas de fusão contendo o peptídeo *SpyTag* em diferentes porções da proteína (C-terminal, N-terminal ou interna) seria então possível purificá-la do meio utilizando resinas contendo uma variante da proteína *SpyCatcher*, purificação esta com eficiência inclusive superior à purificações convencionais usando cauda de histidina (KHAIRIL ANUAR et al., 2019). Esta técnica, se utilizada em sistemas de SPLC poderia, portanto, trazer uma maior eficiência de purificação de proteínas recombinantes.

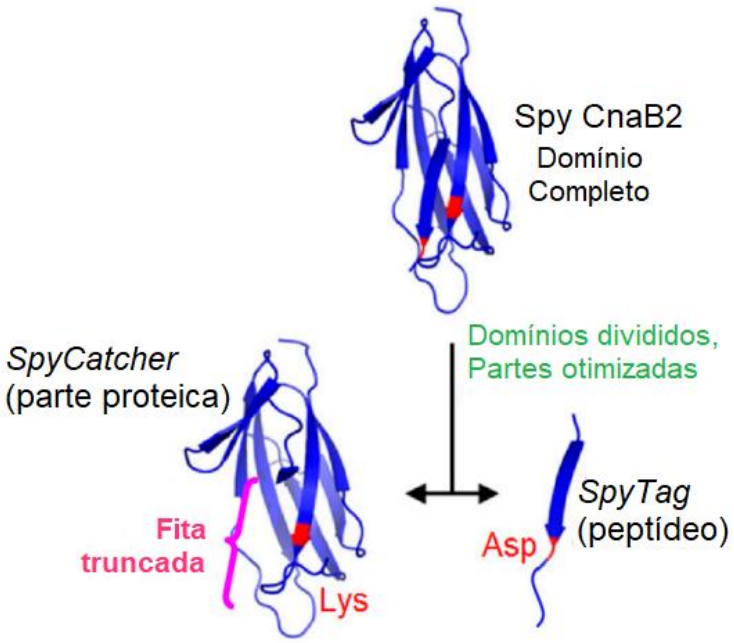


Figura 4. Representação das partes biológicas *SpyCatcher* (à esquerda, porção inferior) e *SpyTag* (à direita, porção inferior). Em vermelho estão representados os aminoácidos envolvidos na reação de ligação peptídica espontânea das partes. Adaptado de Zakeri et al. (2012).

Por fim, todos esses métodos aqui apresentados demonstram a utilidade da bioconjugação no aprimoramento da tecnologia de SPLC, permitindo purificações mais eficientes e facilitando o desenvolvimento de novas biomoléculas. Tais benefícios seriam particularmente interessante para a a ErA, uma vez que simplificaria os atuais métodos utilizados para a sua purificação e permitiria a descoberta de novas variantes com características clínicas mais desejáveis.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVOS PRINCIPAIS

Este projeto tem como principais objetivos:

I. Estudar a viabilidade de expressão da ErA em uma nova plataforma otimizada de SPLC;
II. Conjugar a ErA a bacteriófagos e avaliar estratégias de uso destes conjugados.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em relação ao OBJETIVO I (expressão da ErA por SPLC), os objetivos específicos propostos foram:

a – Desenvolvimento de um extrato celular viável para expressão de proteínas *in vitro;*

b – Simplificação do processo de produção do extrato celular;

c – Desenvolvimento de uma solução energética eficiente e de menor custo possível;

d – Construção de vetores de expressão de ErA para SPLC;

e – Expressão de ErA biologicamente ativa em sistema de SPLC.

Em relação ao OBJETIVO II (conjugação da ErA a bacteriófagos), os objetivos específicos propostos foram:

a – Expressão da ErA solúvel e biologicamente ativa fusionada à proteína *SpyCatcher*;

b – Desenvolvimento de bacteriófagos geneticamente modificados capazes de expressar o peptídeo *SpyTag* fusionado às proteínas principais do capsídeo viral;

c – Conjugação da ErA a bacteriófagos de maneira eficiente e sem implicações na atividade biológica da enzima;

d – Sequenciamento e titulação de conjugados injetados previamente na corrente sanguínea de camundongos.

2 CAPÍTULO I – EXPRESSÃO DA L-ASPARAGINASE EM PLATAFORMA DE SÍNTESE PROTEICA LIVRE DE CÉLULAS

2.1 INTRODUÇÃO

A produção de ErA em tecnologia de SPLC poderia trazer grandes avanços científicos. Por meio dessa plataforma, novas variantes de ErA poderiam ser obtidas, facilitando o desenvolvimento de formas melhoradas do biofármaco. Dada a baixa meia-vida do medicamento e de sua imunogenicidade, o desenvolvimento de uma nova plataforma para sua expressão, permitiria acelerar a busca por novas formas da enzima capazes de suprir as demandas clínicas existentes atualmente no mercado. Diferentemente de sistemas *in vivo* de produção, etapas de transformação, crescimento, indução e diversas etapas de purificação da proteína não seriam mais necessárias. Pelo fato da síntese se dar de forma *in vitro*, bastaria apenas algumas horas até que a proteína fosse produzida e que novas variantes pudessem ser triadas.

A escolha da proteína a ser expressa (ErA) em detrimento da proteína de *E. coli* se dá por inúmeros motivos. O primeiro motivo é que a ErA possui meia-vida plasmática inferior em relação à enzima de *E. coli* (PIETERS et al., 2012). Desta forma, produzi-la em um sistema *in vitro* poderia facilitar o desenvolvimento de formas mais estáveis da proteína, com potencial uso clínico no futuro. O segundo motivo tem caráter mais prático. Curiosamente, a enzima ErA não possui resíduos de cisteína em sua estrutura primária (MINTON et al., 1986)(APÊNDICE A), logo inexistem pontes dissulfeto em sua estrutura. Dessa forma, desenvolver sistemas de SPLC modificados a fim de promover a ligação de pontes dissulfeto viabilizando o dobramento adequado da proteína seria desnecessário.

Por fim, com o crescente desenvolvimento de novos sistemas mais econômicos de produção de biofármacos em sistemas de SPLC, seria possível estudar a viabilidade de se produzir a ErA em maiores escalas, avaliando-se paralelamente o custo dos reagentes empregados tal como a eficiência de tradução proteica, e comparando-os com as etapas convencionais utilizadas para a produção do medicamento. Ademais, por ser um sistema aberto, exclui-se a necessidade de centrifugação e rompimento celular para a obtenção de ErA

recombinante, salas limpas, técnicas atualmente empregadas para a produção industrial de todas as formas deste biofármaco no mercado (GERVAIS et al., 2013) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2015). A purificação por sistemas de cromatografia poderia ser aplicada diretamente na reação, barateando com isso os custos de produção e acelerando sua purificação e posterior caracterização.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Meios de Cultivo

Para transformação de vetores e cultivo de bactérias *E. coli* DH5α (F^- *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20* φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, hsdR17($r_K^- m_K^+$), λ^-), meio LB contendo 1% (m/v) triptona, 0,5% (m/v) extrato de levedura e 0,5% NaCl foi utilizado. Para meio LB sólido, foram utilizados os mesmos reagentes com acréscimo de ágar bacteriológico a uma concentração final de 2% (m/v). Para cultivo de bactérias *E. coli* BL21 (DE3) (*E. coli* str. B F^- *ompT gal dcm lon hsdS*$_B$($r_B^- m_B^-$) λ(DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB*$^+$]$_{K\text{-}12}$(λ^S)), usadas na preparação do extrato celular por sonicação, meio 2X YTPG, contendo 1,36% (m/v) triptona, 1% (m/v) extrato de levedura, 0,5% (m/v) NaCl, 0,7% (m/v) fosfato de potássio dibásico, 0,3% (m/v) fosfato de potássio monobásico e 1,8% (m/v) glicose, foi utilizado. Para cultivo de bactérias *E. coli* BL21(DE3), usadas na preparação dos extratos celulares por prensa francesa, meio 2X YTPG ligeiramente modificado foi usado, contendo 1,6% (m/v) triptona, 1% (m/v) extrato de levedura, 0,5% (m/v) NaCl, 0,913% (m/v) fosfato de potássio dibásico, 0,299% (m/v) fosfato de potássio monobásico e 1,98% (m/v) glicose. Tampão fosfato foi autoclavado separamente dos outros componentes e a glicose foi esterilizada por filtração.

2.2.2 Preparação do Extrato Celular por Sonicação

Cepa de *E. coli* BL21(DE3) foi cultivada em 10 mL de meio 2X YTPG durante 18 hrs a 37 ºC, 200 rpm de agitação. Após o crescimento, todo o inóculo foi diluído em 1000 mL de meio 2X YTPG. Densidade ótica (DO) do cultivo foi medida a 600 nm (DO_{600}) em *SpectraMax M2* (*Molecular Devices*) e, ao atingir DO 0,5, o cultivo foi então induzido com 1 mM de IPTG. Após adição do IPTG, células foram mantidas em cultivo a 37 ºC, 200 rpm de agitação até atingirem DO 3,0. Nesta densidade, células foram então centrifugadas a 3.220 *g*, a 4ºC por 20 min. Sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em Tampão A (10 mM Tris-acetato pH 8,2, 14 mM acetato de magnésio, 60 mM glutamato de magnésio e 2 mM de DTT). A solução foi então centrifugada por 10 min, 4 ºC a 3.220 *g*. O pellet celular foi

rressuspendido em Tampão A e o processo de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Ao final, o *pellet* foi pesado e ressuspendido em 1 mL de Tampão A para cada 1 g de massa celular úmida obtida.

A suspensão foi então submetida ao protocolo de sonicação em sonicador *Branson Digital Sonifier*® com ponteira de 12 mm, feita com a suspensão celular imersa em gelo. Duração de pulso de 10 seg com 30 seg de pausas intercadalas a uma amplitude de 30% foi utilizado. Duração de pulso de sonicação total foi de 2 min e obteve-se ao final suspensão celular com viscosidade reduzida em relação à inicial. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para *eppendorfs* de 1,5 mL e centrifugadas a 15.700 *g* por 10 min, a 4ºC. O sobrenadante foi rapidamente estocado a -80 ºC.

2.2.3 Preparação do Extrato Celular por Homogeneização em Alta Pressão

Extratos celulares obtidos por homogeneização em alta pressão e preparados conforme o Protocolo 1 foram gentilmente oferecidos pelo grupo de pesquisa da Profª Dra. Solange Serrano situado no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantã. Cepa de *E. coli* BL21 (DE3) foi cultivada em 10 mL de meio 2X YTPG durante 18 hrs a 37 ºC, 200 rpm de agitação. Após o crescimento, todo o inóculo foi diluído em 1000 mL de meio 2X YTPG e células foram cultivas até DO de 2,5 (Protocolo 1) ou induzidas por IPTG após atingir DO 0,5 e depois cultivas até DO 2,5 (Protocolo 2). DOs foram medidas em *SpectraMax M2* (*Molecular Devices*).

Células foram então centrifugadas a 5.000 *g*, a 4 ºC por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 30 mL de Tampão S30A (10 mM Tris-acetato pH 8,2, 14 mM acetato de magnésio, 0,6 mM de KCl e 6 mM de 2-mercaptoetanol). Células foram centrifugadas e lavadas com o mesmo tampão por mais duas vezes, sendo a última etapa de centrifugação extendida para 30 min. Ao final, o *pellet* foi pesado e ressuspendido em 1,1 mL de Tampão S30B (10 mM Tris-acetato pH 8,2, 14 mM acetato de magnésio, 0,6 mM de KCl, 1 mM de DTT e 0,1 mM de PMSF) para cada 1 g de massa celular úmida obtida. Células foram então submetidas à prensa francesa (*French Pressure Thermo Scientific*), a 1.500 psi, repetindo-se o procedimento por três vezes.

Após lise celular, extratos foram submetidos a dois tipos de protocolos diferentes. No Protocolo 1, células foram centrifugadas a 30.000 *g*, a 4ºC por 30 min. O sobrenadante não turbido foi coletado e transferido a um novo tubo e centrifugado novamente na mesmas condições. 400 mM de NaCl foram adicionados e o extrato foi mantido a 42ºC por 45 min. Após, o extrato foi dialisado em 5 L de tampão S30C (10 mM Tris-acetato pH 8,2, 14 mM acetato de magnésio, 0,6 mM de acetato de potássio e 0,5 mM de DTT) por 2 hrs a 4ºC e novamente por 16 hrs a 4ºC. O extrato dialisado foi centrifugado a 30.000 *g* por 30 min a 4ºC e a porção não turbida do sobrenadante foi coletado e estocado a -80ºC. No Protocolo 2, após a etapa de lise celular, o extrato foi centrifugado a 12.000 *g* por 10 min a 4ºC. A porção não turbida foi coletada e foi ressubmetida à centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi então incubado a 37ºC por 30 min a uma agitação de 280 rpm e logo depois estocado a -80ºC.

2.2.4 Solução Energética

Protocolos e reagentes da solução energética foram gentilmente oferecidos pelo grupo de pesquisa da Profª Dra. Solange Serrano situado no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantã. Inicialmente, foram preparadas soluções estoques dos reagentes listados abaixo (Tabela 1):

Tabela 1. Lista de reagentes estoque. (*) Diferentes soluções de aminoácidos foram preparadas em tampões correspondentes às suas características físico-químicas. Aminoácidos ácidos foram dissolvidos em meio ácido contendo 1 M HCl, aminoácidos básicos foram dissolvidos em meio alcalino contendo 1 M KOH enquanto aminoácidos neutros foram dissolvidos em água.

Reagente	**Concentração (mM)**
CTP	100
GTP	100
UTP	100
ATP	100
HEPES	2000
Ácido Folínico	10
AMP Cíclico	100
Espermidina	1000
Acetato de Amônio	9200
Aminoácidos (Todos os 20)*	50 (cada)
CP	1000

Reagente	Concentração (mM)
Glutamato de Potássio	4000
Acetato de Magnésio	1070
DTT	500
IPTG	50

Além dessas soluções estoque, foram adquiridas comercialmente soluções de creatina quinase (10 mg/mL) e RNA transportador (17,5 mg/mL). T7 RNA polimerase também foi utilizada em nossos experimentos e foi preparada *in house*, de acordo com protocolo de Schwarz et. al (SCHWARZ et al., 2007). Concentração final dos reagentes (ver item 2.2.6) consiste na adição dos reagentes apresentados acima com o extrato celular de interesse e o DNA molde.

2.2.5 Obtenção dos Vetores

O gene GFP foi gentilmente oferecido pelo grupo de pesquisa da Profª Dra. Solange Serrano situado no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantã. O mesmo se encontra inserido no plasmídeo pIVEX 2.3. Para a construção do vetor contendo o gene para a ErA, utilizou-se como molde a sequência do gene *ansB* de *E. chrysanthemi* otimizado para expressão em *E. coli* (APÊNDICE A). Gene previamente clonado no vetor pET15b (*ansB*_pET15b) foi transferido ao vetores pIVEX 2.4d, pIVEX 2.3d ou pSB1A2 conforme procedimentos descritos a seguir. Plasmídeos pIVEX foram previamente desenvolvidos para expressão de proteínas por SPLC (HOFFMANN et al., 2004).

2.2.5.1 Amplificação do Gene *ansB*

Reação de PCR contendo o plasmídeo *ansB*_pET15b como molde foi realizada utilizando iniciadores capazes de incluir o sítio de restrição *NotI* na porção 5’ do gene e o sítio de restrição *XhoI* na porção 3’ do mesmo, para produção dos plasmídeos ErA_pIVEX 2.4d ou ErA_pIVEX 2.3d. Sítios de restrição *EcoRI* e *XbaI* na porção 5’ do gene e *SpeI* e *PstI* na porção 3’ do gene foram incluídas para construção do plasmídeo ErA_pSB1A2. Plasmídeos ErA_pET15b e ErA_pET15b com mutação V293M haviam sido previamente construídos pelo nosso grupo. A amplificação foi feita de forma a retirar a sequência sinalizadora nativa

(de exportação da proteína para o periplasma) do gene (APÊNDICE A), mantendo apenas a sequência responsável pela tradução da cadeia proteica madura (Figura 5).

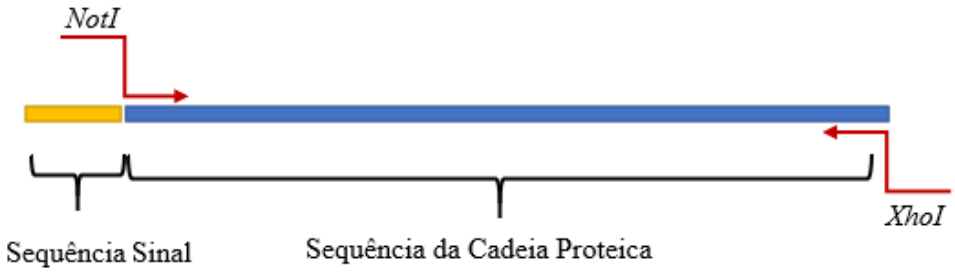


Figura 5. Esquematização da estratégia de obtenção do gene *ansB* de *E. chrysanthemi* do vetor pET15b. Em vermelho estão representados os iniciadores sintetizados para a reação de PCR contendo no iniciador direto a sequência para o sítio de restrição *NotI* na porção 5' e no iniciador reverso a sequência do sítio de restrição *XhoI* a ser inserido na porção 3' da sequência do gene. Em amarelo, sequência sinalizadora nativa de localização periplasmática da proteína (aminoácidos 1-21) e em azul sequência codificadora da proteína final (aminoácidos 22- 348).

Os iniciadores foram sintetizados pela empresa Exxtend (Paulínia – SP, Brasil). Foram utilizados os iniciadores ErA_pIVEX FW (direto) e o ErA_pIVEX RV (reverso) para os plasmídeos ErA_pIVEX 2.4d e ErA_pIVEX 2.3d e os iniciadores ErA_pSB1A2 FW (direto) ErA_pSB1A2 RV (reverso) para o plasmídeo ErA_pSB1A2 (APÊNDICE A). A amplificação foi realizada em termociclador Veriti da Applied Biosystems. A enzima DNA polimerase *Platinum® PFX* (*Invitrogen*^{TM}) foi utilizada na reação de PCR e solução de 50 µL de reação foi preparada nas seguintes concentrações finais: 1X de tampão PFX, 0,3 mM de dNTPs, 1 mM de $MgSO_4$, 0,3 µM de iniciador direto, 0,3 µM de iniciador reverso, 0,02 U/µL de *Platinum® PFX DNA polimerase* e 1 ng/µL do plasmídeo *ansB*_pET15b. Os seguintes parâmetros de PCR foram utilizados: primeiro passo a 94°C por 5 min, segundo passo repetido 30 vezes a 94°C por 15 seg, 55°C por 30 seg e 68°C por 1 min e último passo a 68°C por 10 min. Após amplificação, o gene *ansB* foi purificado do meio reacional usando o kit de purificação comercial *Illustra*^{TM} *GFX*^{TM} *PCR DNA and Gel Band Purification* (GE), seguindo as recomendações do fabricante.

2.2.5.2 Digestão/Ligação das Partes e Transformação

Gene *ansB* amplificado e vetores pIVEX 2.4d ou pIVEX 2.3d foram digeridos com as enzimas *NotI-HF* e *XhoI* (*New England BioLabs*®). 30 µL de reação foram preparadas contendo concentrações finais dos seguintes componentes: 1X tampão *CutSmart*® , 3 U/µL de *NotI-HF*, 0,7 U/µl de *XhoI* e 17 ng/µLde DNA molde. Amostras foram incubadas por 37°C durante 60 min. Após a digestão, toda a reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% (corado com brometo de etidio - concentração 0,375 µg/mL) a 90 V e, em seguida, bandas referentes ao gene da ErA e aos vetores digeridos foram purificadas do gel por meio do kit comercial *Illustra*™ *GFX*™ *PCR DNA and Gel Band Purification* (GE), de acordo com o protocolo do próprio fabricante. Em seguida, com as partes devidamente digeridas e purificadas, procedeu-se com a reação de ligação. Foram adicionados 4 µL de cada DNA purificado (concentração aproximada de 25 ng/µL cada) em uma reação de volume final igual à 20 µL contendo 1X de tampão T4 DNA Ligase e 0,15 U/µl de T4 DNA ligase (*Promega*). A reação ocorreu a 16 ºC por 60 min e a enzima foi inativada por tratamento térmico, a 80 °C por 20 min.

O vetor ErA_pSB1A2 foi produzido por meio de dois passos de clonagem. No primeiro passo, o gene *asnB* amplificado foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *SpeI*. O terminador de transcrição T7 (fornecido por iGEM, código BBa_B0015) foi digerido com as enzimas *XbaI* e *PstI* e o vetor pSB1K3 (fornecido por iGEM) com as enzimas *EcoRI* e *PstI*. Todas as partes digeridas foram purificadas do gel por meio do kit comercial *Illustra*™ *GFX*™ *PCR DNA and Gel Band Purification* (GE), seguindo recomendações do fabricante e ligadas utilizando T4 DNA ligase. No segundo passo, o plasmídeo resultante foi digerido com as enzimas *XbaI* e *PstI* para obtenção da parte contendo o gene da asparaginase juntamente com o terminador de transcrição (ErA_TT) e ligado ao promotor T7 juntamente com o RBS (T7_RBS), os quais foram digeridos com *EcoRI* e *SpeI* (fornecido por iGEM, código BBa_K525998). O vetor pSB1A2 foi digerido com *EcoRI* e *PstI* e ligado às partes anteriores, formando assim o produto final (Figura 6).

As reações de ligação foram transformadas em linhagens de bactéria DH5α por eletroporação. Bactérias transformadas foram plaqueados em meio LB contendo 50 µg/mL de carbenicilina e incubadas por 16 hrs a 37°C.

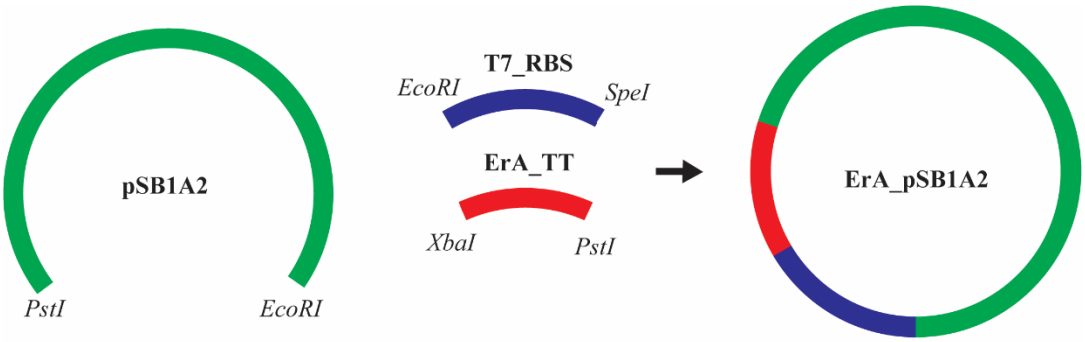


Figura 6. Esquematização do segundo passo de clonagem para obtenção do vetor final ErA_pSB1A2. Parte contendo o promotor T7 e RBS foi digerida com as enzimas *EcoRI* e *SpeI* (T7_RBS); parte contendo gene da ErA fusionado ao terminador de transcrição T7 foi digerida com as enzimas *XbaI* e *PstI* (ErA_TT) e o vetor foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *PstI* (pSB1A2). Todas as partes foram ligadas, formando com isso o vetor final de interesse (ErA_pSB1A2).

2.2.5.3 Triagem e Amplificação do Vetor Final

Colônias foram selecionadas aleatoriamente da placa LB e inoculadas em meio LB contendo 50 µg/mL de carbenicilina. Células foram cultivadas por 16 hrs e plasmídeos foram purificados seguindo as instruções do kit de minipreparaçao plasmidial *E.Z.N.A*® (*OMEGA bio-tek*). Plasmídeos foram submetidos à digestão analítica utilizando as mesmas enzimas usadas para a sua construção (*NotI-HF* e *XhoI* para ErA_pIVEX 2.3d e 2.4d e *EcoRI* e *PstI* para ErA_pSB1A2) e submetidas a sequenciamento.

A fim de se obter quantidade suficiente de DNA plasmidial para a reação de SPLC, os vetores foram purificados por maxipreparação plasmidial seguindo o protocolo do kit

comercial *Wizard® Plux Maxipreps DNA Purification System* (*Promega*). Plasmídeos também puderam ser purificados por minipreparação plasmidial para utilização em reações de SPLC.

2.2.6 Reação de SPLC

Reação SPLC foi realizada em *eppendorf* de 1,5 mL a 30°C por 3 hrs a 300 rpm. Inicialmente, foram preparadas duas misturas (Mistura A e Mistura B), que em seguida foram adicionadas ao tampão final contendo todos os reagentes necessários para a síntese *in vitro* da proteína de interesse. As concentrações finais utilizadas de cada reagente estão sumarizadas na Tabela 2. Foram preparadas reações de volumes finais igual a 25 ou 50 µL.

Tabela 2. Concentração final dos reagentes utilizados nas reações de SPLC para síntese *in vitro* das proteínas ErA e GFP. (*) Quantidades foram variadas entre 14 a 20 mM, no caso do acetato de magnésio; entre 0 a 3,4 mM no caso do DTT. (**) Quando adicionado, concentração de 1 mM de IPTG foi empregada. (***) Quando adicionados, concentrações de 20 mM de asparagina e glutamina foram empregadas.

Mistura	**Reagente**	**Concentração Final**
A (15X)	Aminoácidos solúveis em água	1 mM
	Aminoácidos solúveis em ácido	1 mM
	Aminoácidos solúveis em base	1 mM
B (10X)	CTP	0,8 mM
	GTP	0,8 mM
	UTP	0,8 mM
	ATP	1,2 mM
	HEPES	55 mM
	Ácido Folínico	68 µM
	AMP Cíclico	0,64 mM
	Espermidina	2 mM
	Acetato de Amônio	27,5 mM
Final	A	1X
	B	1X
	CP	80 mM
	Glutamato de Potássio	350 mM
	Acetato de Magnésio	*

Mistura	Reagente	Concentração Final
Final	Creatina Quinase	250 μg/mL
	T7 RNA Polimerase	27 μg/mL
	tRNA	0,175 mg/mL
	DTT	*
	IPTG	**
	Asparagina/Glutamina	***
	Extrato Celular	30% (v/v)
	DNA	16 ng/μL

Ao final da reação, a solução foi centrifugada a 14.000 *g* por 5 min a 4°C de forma a separar o sobrenadante dos produtos insolúveis formados durante a reação. Sobrenadante e porção insolúvel foram submetidos às análises subsequentes.

2.2.7 Purificação da ErA

Reação de SPLC contendo ErA foi diluída 100 vezes em tampão de equilíbrio (20 mM fosfato de potássio, 20 mM imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4) e submetida à cromatografia por afinidade utilizando coluna *HisTrap*^{TM} *HP* (*GE Healthcare*) de 5 mL. Coluna foi previamente carregada com 2,5 mL de solução 100 mM de $NiSO_4$ e depois lavada com 50 mL de água destilada. Em seguida, a coluna foi equilibrada com 50 mL de tampão de equilíbrio e depois carregada com a amostra. 50 mL de tampão de lavagem foi então utilizado (20 mM fosfato de potássio, 50 mM imidazol, 300 mM NaCl, pH 7,4). Proteína foi eluída com tampão de eluição (20 mM fosfato de potássio, 500 mM imidazol, 300 mM NaCl, pH 7,4) e coletada em frações de 0,5 mL. Colunas PD10 (*GE Healthcare*) foram usadas para dessalinização e troca de tampão da amostra.

2.2.8 Concentração de Proteínas Totais

Concentração proteica dos extratos celulares foi quantificada em triplicata através do método de Bradford. 10 μL de amostra foram misturadas em 200 μL do reagente de *Bradford* previamente diluído 5X em água ultrapura. Absorbância foi medida a 595 nm, após 5 min de incubação, em espectrofotômetro *SpectraMax M2* (*Molecular Devices*). O valor da concentração proteica foi obtido a partir dos dados obtidos com a curva de calibração

previamente contruída. Curva de calibração foi construída utilizando concentrações conhecidas de albumina bovina sérica (BSA) (*Merck*) como padrão (APÊNDICE B).

2.2.9 Fluorescência

Fluorescência emitida pelas reações contendo GFP como proteína repórter foi quantificada em espectrofluorímetro *SpectraMax M2* (*Molecular Devices*). Solução de SPLC foi previamente diluída em água ultrapura, adicionada à microplaca preta de fundo transparente e a fluorescência foi medida a 480 nm de excitação e 520 nm de emissão.

2.2.10 Ensaio Enzimático

Todas as atividades enzimáticas foram quantificadas pelo método de Nessler. 10 µL de amostra proteica foi incubada com solução pré-aquecida a 37°C composta por 23,8 mM Tris HCl pH 7,4 e 9 mM de L-Asparagina por 40 min a 37°C. Reação foi interrompida após adição de 70 mM de ácido tricloroacético (TCA) e diluída 21,5 vezes em água. Reagente de Nessler (*Sigma*) foi adicionado a uma concentração final de 10% v/v e absorbância foi medida a 436 nm depois de 1 minuto. Atividade enzimática foi medida em U/mL, onde U é definido como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 µmol de amônia resultante da hidrólise do aminoácido L-aspararagina por minuto a 37°C. Curva padrão de $(NH_4)_2SO_4$ (APÊNDICE B) foi usada para quantificação da atividade por interpolação dos pontos de absorbância obtidos experimentalmente das reações com ErA. Para o controle negativo, amostra proteica foi adicionada somente após adição de TCA.

2.2.11 Eletroforeses

Amostras de DNA foram analizadas por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), 0,375 µg/mL brometo de etídeo e 1X tampão TAE (40 mM Tris, 0,11% (v/v) ácido acético e 1mM EDTA, pH 8,0). As amostras foram submetidas a eletroforese horizontal em fonte de voltagem Bio Rad ® a 90 V. Foi utilizado marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (*Invitrogen*™, Carlsbald).

Análises de expressão proteica e purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Gel de separação continha: 12,5% (m/v) acrilamida, 0,3% (m/v) bis-acrilamida, 0,38 M Tris-HCl pH 8,8, 0,06% (m/v) persulfato de amônio (PSA) e 0,1% (v/v) TEMED. Gel de entrada continha: 4% (m/v) acrilamida, 0,1% (m/v) bis-acrilamida, 0,1 M Tris-HCl pH 6,8, 0,06% (m/v) PSA e 0,1% (v/v) TEMED. As amostras foram submetidas à eletroforese vertical em tampão de corrida Tris-glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina e 0,1% (m/v) SDS) a 150V. Geis foram corados com solução contendo 0,3% de *coomassie* R-250, 10% metanol e 10% ácido acético; e descorados com solução aquosa contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético. Foi utilizado padrão de massa molecular *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*™, Waltham, EUA)

2.2.12 *Western Blotting*

Amostras proteicas separadas por géis de poliacrilamida (não coradas com *coomassie*) foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) por eletrotransferência horizontal a 95V por 50 min em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 2% (v/v) metanol). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio contendo 5% (m/v) de leite desnatado em tampão T-TBS (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl e 0,05% (v/v) Tween® 20, pH 7,5) durante 3 hrs e depois incubada com anticorpo policlonal produzido em coelhos anti-ErA (obtido sob encomenda da empresa *Rheabiotech*) (1:2000) por 16 hrs a 4ºC. Após esse período, a membrana foi lavada com tampão T-TBS três vezes. Em seguida, 20 mL de solução de anticorpo secundário anti-rabbit conjugado à fosfatase alcalina (*Invitrogen*™, Carlsbald) foi aplicada à membrana por 1 hr. Após incubação com anticorpo, membrana foi novamente lavada com tampão T-TBS três vezes e, por fim, solução reveladora foi aplicada (100 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,4 mM azul de nitro-tetrazólio (NBT) e 0,4 mM fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP,) pH 9,5) até detecção das bandas.

Para detecção de proteínas com cauda de histidina (primeira ErA testada e GFP), membrana bloqueada foi incubada com 10 mL de solução de anticorpo anti-6X his tag, conjugado à peroxidase (*Roche*) (1:2000) em tampão T-PBS (2,7 mM NaH_2PO_4, 7,7 mM Na_2HPO_4, 150mM NaCl e 0,05% (v/v) Tween® 20) por 3 hrs, no lugar do anticorpo anti-ErA.

Membrana foi lavada com tampão T-PBS e revelada com 1 mL de solução do kit *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (*GE Healthcare*), cuja quimioluminiscência pôde então ser detectada em câmara escura com tempos de exposição variáveis, a depender da concentração proteica presente. Equipamento *Chemiluminescence Documentation System* (UVITEC, Cambridge) foi utilizado para este fim.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os principais resultados obtidos com o desenvolvimento de uma nova plataforma simplificada de SPLC, tal como sua utilização para expressão *in vitro* da enzima ErA. De maneira geral, os resultados podem ser divididos em três grandes áreas: (1) desenvolvimento do extrato celular bacteriano, (2) desenvolvimento e otimização da solução energética e (3) construção do plasmídeo e expressão da ErA.

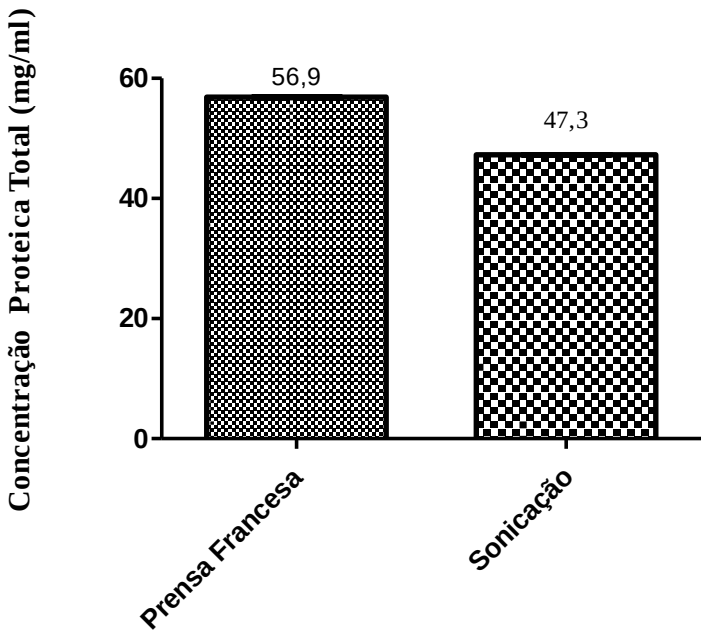
2.3.1 Desenvolvimento do Extrato Celular

Extratos celulares bacterianos foram obtidos por meio de duas técnicas: prensa francesa (*French press*) e sonicação. Os extratos por prensa francesa (ou homogeneização em alta pressão) foram gentilmente oferecidos pelo Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantã, sob supervisão da Profa. Dra. Solange Maria de Toledo Serrano. Os extratos celulares por sonicação foram preparados em nosso próprio laboratório. Como teste preliminar para avaliação da eficiência do método de lise celular, foi quantificada a concentração proteica dos lisados através do método de *Bradford*. Concentração proteica de extratos obtidos por prensa francesa foi ligeiramente superior à concentração obtida em lisados obtidos por sonicação. (Figura 7a).

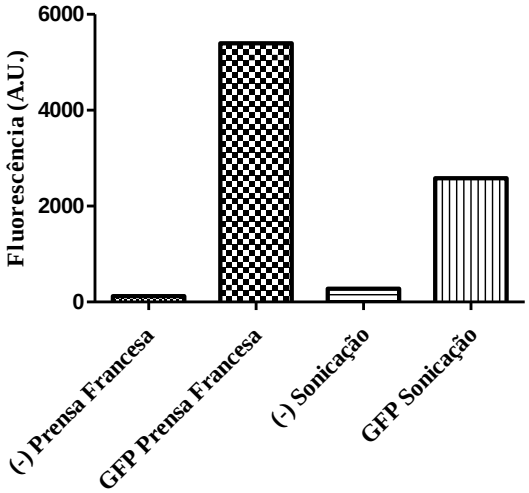
Nota-se que, embora a lise celular em alta pressão tenha obtido extratos com concentração proteica superior à sonicação, tais valores não representam uma diferença de concentração proteica total considerável. Além do mais, é importante destacar que meios e condições de cultivo diferentes foram usados para a obtenção de cada extrato. Estes fatores devem ser levados em consideração em trabalhos futuros, de forma a se estudar o real efeito do método de lise, independentemente da presença de outros fatores (ver item 5 PERSPECTIVAS FUTURAS). De qualquer forma, os resultados preliminares obtidos com nosso trabalho demonstram que possivelmente deve existir uma pequena diferença de concentração proteica obtida entre esses métodos. De fato, as eficiências de lise celular reportadas para cada um dos métodos é bastante similar, ambas atingindo valores superiores a 98.8% (SHRESTHA; HOLLAND; BUNDY, 2012).

Em seguida, os extratos não induzidos com IPTG, foram testados quanto à sua capacidade de expressão da proteína GFP. Para este teste, ambos os extratos foram suplementados com a solução energética padrão desenvolvida pelo Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantã, sob supervisão da Profa. Dra. Solange Maria de Toledo Serrano (mais detalhes quanto à solução energética serão dados adiante, na seção "2.3.2 Desenvolvimento da Solução Energética"). Plasmídeo pIVEX 2.3d contendo o gene da GFP foi utilizado como DNA molde para a reação. Obteve-se ao final os seguintes níveis de expressão (Figura 7 b,c):

a



b



c

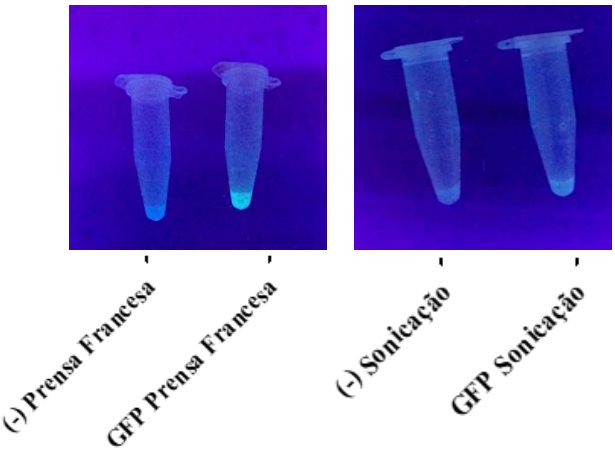


Figura 7. Comparação de métodos para obtenção de extratos proteicos. (a) Concentração proteica total dos extratos celulares quantificada pelo método de *Bradford*, n = 3. Desvio padrão não pôde ser visualizado nos gráficos acima por ser muito baixo. Valores foram normalizados por massa úmida de células (b) Níveis de expressão da GFP entre os diferentes extratos quantificados por fluorescência (480nm excitação/520nm emissão). Valores foram normalizados em função da concentração proteica medida para cada extrato. (c) Níveis de expressão da GFP entre os diferentes extratos observados a olho nu sob radiação ultravioleta. Em ambos os casos (-) indica reações controle sem a presença do plasmídeo.

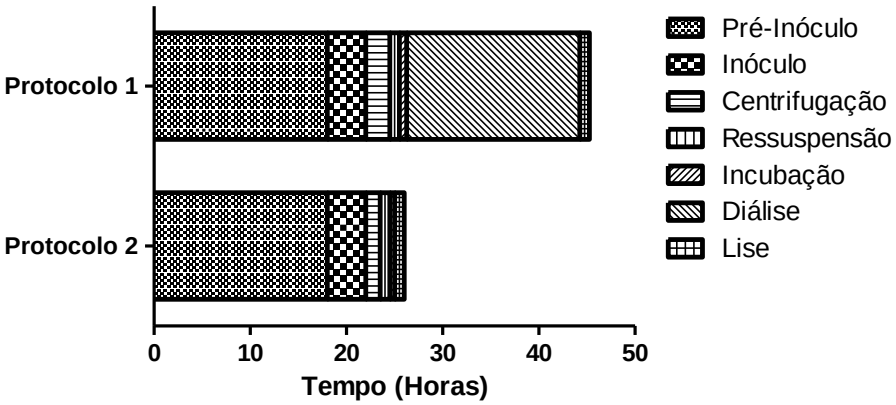
Com base nos resultados acima, conclui-se que o sistema de expressão por SPLC foi capaz de sintetizar com sucesso a proteína GFP. Nota-se claramente que os extratos obtidos por homogeneização em alta pressão (ou prensa francesa) tiveram resultados significativamente superiores em relação aos extratos obtidos por sonicação, embora a concentração proteica entre ambas tenha sido similar. A fluorescência medida nos extratos obtidos por prensa francesa foi de aproximadamente 5397 A.U., valor este 2,1 vezes maior em relação à fluorescência observada para extratos obtidos por sonicação (aproximadamente 2581 A.U.) Shrestha et al. reportaram também uma menor eficiência de expressão da GFP utilizando extratos obtidos em relação à prensa francesa. Extratos obtidos por este método foram capazes de sintetizar 25% menos GFP. No entanto, eficiências semelhantes foram obtidas com tempos maiores de sonicação (SHRESTHA; HOLLAND; BUNDY, 2012). Uma possível explicação para essa diferença pode estar relacionada à possibilidade de denaturação proteica em decorrência da variação térmica exercida na etapa de sonicação (KWON; JEWETT, 2015). De qualquer forma, vale ressaltar a importância de expressão da GFP utilizando extratos obtidos por sonicação. Por ser uma técnica mais simples, de fácil acesso e com um custo consideravelmente mais baixo em relação à prensa francesa (SHRESTHA; HOLLAND; BUNDY, 2012) a sonicação como método de produção de extrato é interessante para a popularização desta tecnologia.

Uma vez que nosso interesse está direcionado principalmente ao estudo da viabilidade de expressão da ErA em SPLC, decidimos manter nossos estudos em extratos produzidos por homogeneização em alta pressão, dada sua maior eficiência em relação à expressão da GFP. Para obtenção deste extrato, um protocolo relativamente extenso havia sido seguido (Protocolo 1) (SCHWARZ et al., 2007), e por isso decidimos simplificá-lo.

Alteramos duas importantes etapas deste procedimento. Primeiramente, por usarmos linhagens de *E. coli* BL21(DE3), decidimos induzir o cultivo celular com IPTG a uma D.O. entre 0,6 e 0,8 após a preparação do inóculo, a fim de produzir T7 RNA polimerase de maneira endógena. A cepa de BL21(DE3) possui uma cópia do gene para RNA polimerase do bacteriófago T7, sob controle do promotor lacUV5, o qual é induzível por IPTG (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Além disso, após a lise celular por prensa francesa, decidimos não incluir a etapa de adição de sal e diálise, seguindo instruções de um novo protocolo mais simplificado e adaptando-o para este projeto (Protocolo 2) (SHRESTHA; HOLLAND; BUNDY, 2012), o que resultou em uma diminuição considerável no tempo de preparação do extrato (Figura 8 a). A etapa de adição de cloreto de sódio e posterior diálise presente no Protocolo 1, requeria a utilização de grandes volumes de tampão de diálise. Segundo os autores, esta última etapa seria necessária para remoção de RNAm endógeno presente no extrato, diminuindo a expressão de proteínas que não sejam de interesse, e aumentando a velocidade inicial de expressão proteica (SCHWARZ et al., 2007)(APPONYI et al., 2008). No Protocolo 2, no entanto, o extrato seria mantido apenas a 37ºC por trinta minutos após a etapa de lise celular. Com isso, os ribosomos completariam a tradução de RNAm endógenos que ficaram ligados no momento da lise celular, sendo estes subsequentemente degradados por RNases nativas e liberando os ribossomos para a síntese da proteína de interesse (DES SOYE et al., 2018).

Importante destacar que as etapas de centrifugação após a lise celular descritas no Protocolo 1, requerem uma alta velocidade de centrifugação (30.000 *g*), enquanto que no Protocolo 2, a velocidade requerida passa para 12.000 *g*. Esta alta velocidade de centrifugação também é descrita para lise celular por prensa francesa no protocolo inicialmente proposto para este projeto (KWON; JEWETT, 2015). Ao diminuir a velocidade de centrifugação, conseguimos utilizar uma maior variedade de centrífugas, aumentando consequentemente a acessibilidade da técnica. Ao final, mesmo com todas as alterações descritas, a eficiência de expressão proteica do sistema se manteve: 769,6 ± 149,5 A.U. de fluorescência para extratos produzidos com base no Protocolo 1, e 923,3 ± 97,2 para extratos produzidos com base no Protocolo 2 (Figura 8 b).

a



b

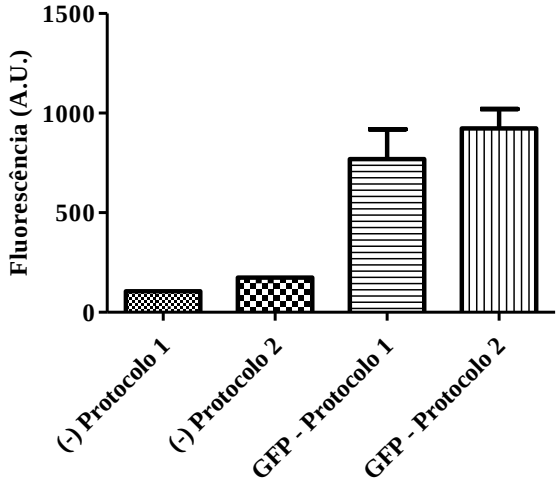


Figura 8. Tempo de preparação e eficiência dos extratos celulares obtidos por prensa francesa (a) Comparação do tempo médio para realização de cada etapa durante a preparação do extrato celular por prensa francesa. Tempo total médio utilizado para preparação do extrato baseado no primeiro protocolo corresponde a aproximadamente 45 hrs, enquanto que no protocolo simplificado esse tempo cai para 26 hrs, devido principalmente à eliminação da etapa de diálise. (b) Comparação da eficiência dos extratos produzidos por dois diferentes protocolos quanto à expressão da GFP. (-) indica reações controle sem plasmídeo. Amostras foram diluídas e fluorescência das reações foi quantificada, n=3. Barras representam desvio padrão. Não há diferença estatística entre os dois métodos (p = 0,2). Análise estatística por teste de *Mann-Whitney* foi realizada.

2.3.2 Desenvolvimento da Solução Energética

A solução energética é uma peça fundamental durante o desenvolvimento de um sistema de SPLC. Ela é responsável pelo fornecimento de todos os substratos e recursos

energéticos necessários para a transcrição do DNA e síntese da proteína de interesse, sendo descritas uma grande variedade de soluções energéticas na literatura (JEWETT; SWARTZ, 2004) (SHIMIZU et al., 2001) (CASCHERA; NOIREAUX, 2014).

Inicialmente, decidimos testar uma das soluções energéticas de menor custo encontradas na literatura (CAI et al., 2015). A solução se baseia na utilização de altas concentrações de glutamato de potássio como fonte secundária de energia que, por sua vez, é capaz de regenerar ATP através da fosforilação oxidativa (JEWETT et al., 2008). A utilização desta fonte, em conjunto com a eliminação completa de outros reagentes de alto custo na reação como RNAt, piruvato, CoA e NAD, foram capazes de reduzir o custo geral da reação em 95% (CAI et al., 2015).

Infelizmente, após diversas tentativas e utilizando diferentes extratos celulares, não fomos capazes de expressar proteínas utilizando esta solução energética. Acredita-se que o problema esteja ligado ao cultivo celular da bactéria para preparação do extrato, um vez que o crescimento realizado neste projeto foi baseado na utilização de *shakers* (neste caso, curvas de crescimento de bactérias *E. coli* em meio LB geralmente atingem DO máxima 5.0) (QIAGEN, 2020), mas de acordo com a metodologia descrita pelo grupo de pesquisa, este crescimento foi feito em biorreatores, onde o cultivo foi capaz de atingir altas densidades celulares (D.O ~ 45) (CAI et al., 2015), o que aumentaria consideravelmente a concentração de ribossomos e outros componente celulares nos extratos e portanto permtiria a utilização desta solução energética (APPONYI et al., 2008).

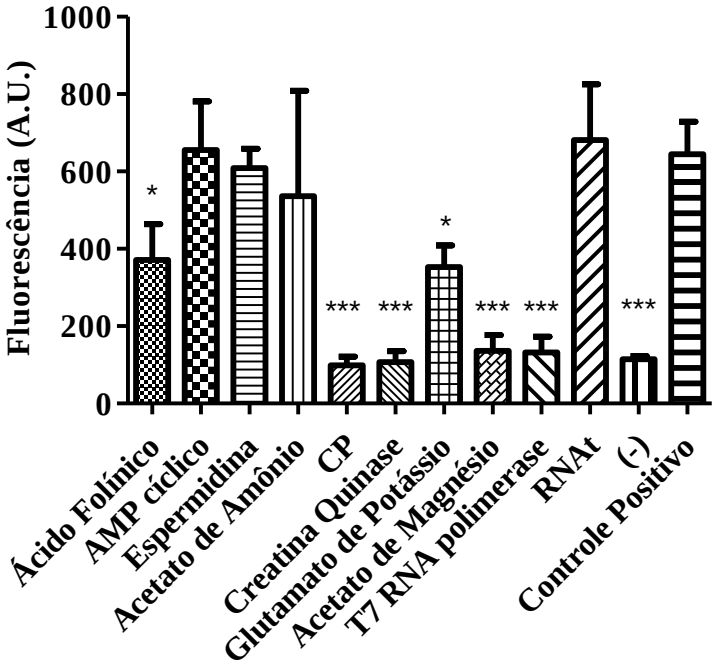
Decidimos por isso concentrar nossos esforços na solução energética já desenvolvida pelo grupo de pesquisa Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantã (Tabela 3), e tentar simplificá-la com o intuito de manter ou aumentar o rendimento de expressão e de diminuir o custo total ao mesmo tempo.

Tabela 3. Lista de todos os reagentes originalmente utilizados na solução energética e suas principais funções biológicas.

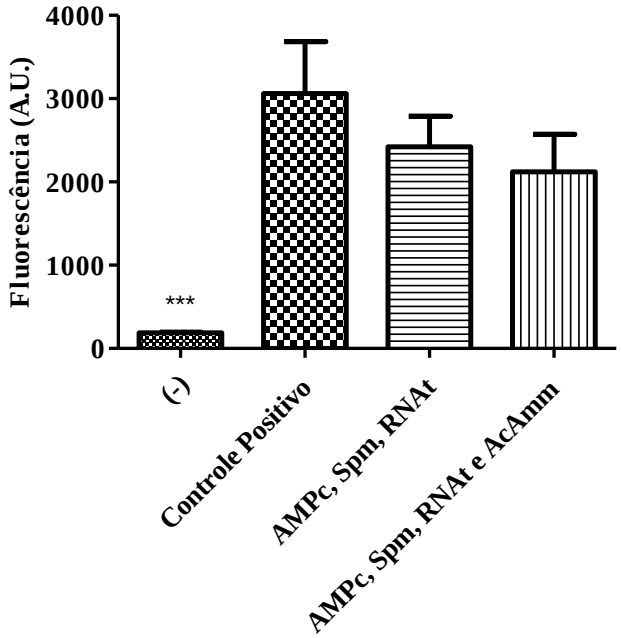
Reagente	Função Principal	Referência
Aminoácidos	Formação de proteínas	(CAI et al., 2015)
Nucleotídeos	Formação de RNAm	(CAI et al., 2015)
HEPES	Manutenção do pH	(JEWETT; SWARTZ, 2004)
Ácido Folínico	Precursor na síntese de formilmetionina	(CAI et al., 2015)
AMP cíclico	Ativação de múltiplos processos celulares	(DOPP; TAMIEV; REUEL, 2019)
Espermidina	Estabilização do RNAm	(DOPP; TAMIEV; REUEL, 2019)
Acetato de Amônio	Fonte de nitrogênio	(DOPP; TAMIEV; REUEL, 2019)
Fosfocreatina	Regeneração de ATP	(SCHWARZ et al., 2007)
Creatina Quinase	Regeneração de ATP	(SCHWARZ et al., 2007)
Glutamato de Potássio	Regeneração de ATP	(CAI et al., 2015)
Acetato de Magnésio	Síntese proteica e estabilização de ácidos nucleicos	(CAI et al., 2015; DOPP; TAMIEV; REUEL, 2019)
T7 RNA polimerase	Transcrição do RNAm sob regulação do promotor T7	(LEHNINGER et al., 2005)
Extrato Celular	Fornecimento de componentes essenciais de transcrição e tradução	(SCHWARZ et al., 2007)
RNAt	Tradução proteica	(LEHNINGER et al., 2005)
DNA	Gene codificador da proteína de interesse	(LEHNINGER et al., 2005)

Na primeira etapa, decidimos manter os substratos essenciais para a síntese (como nucleotídeos, aminoácidos e extrato celular) e eliminar completamente aqueles que poderiam ter pouca influência sobre a síntese proteica. Utilizando o extrato produzido por prensa francesa e produzido de acordo com o Protocolo 1, os seguintes níveis de expressão de GFP foram obtidos após a eliminação dos componentes (Figura 9 a):

a


Fluorescência (A.U.)
1000
800
600
400
200
0
*
***
***
*
***
***
***
Ácido Folínico
AMP cíclico
Espermidina
Acetato de Amônio
CP
Creatina Quinase
Glutamato de Potássio
Acetato de Magnésio
T7 RNA polimerase
RNAt
(-)
Controle Positivo

b


Fluorescência (A.U.)
4000
3000
2000
1000
0
***
(-)
Controle Positivo
AMPc, Spm, RNAt
AMPc, Spm, RNAt e AcAmm

c

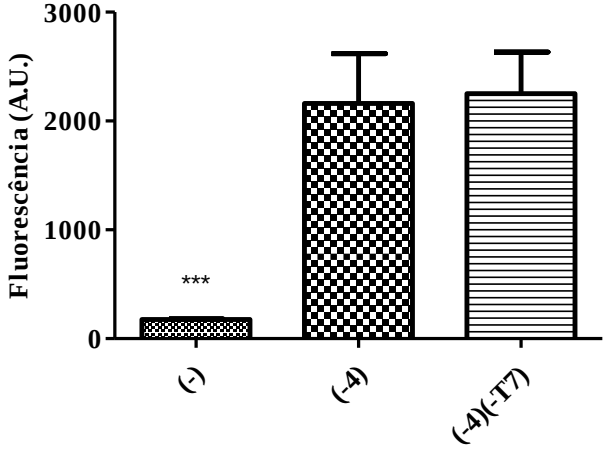

Fluorescência (A.U.)
3000
2000
1000
0
***
(-)
(-4)
(-4)(-T7)

Figura 9. Testes de otimização da solução energética com base na expressão da GFP. (a) Eficiência da reação quanto à produção da GFP em função da eliminação de um reagente. (b) Eficiência da reação quanto à produção da GFP em função da eliminação de AMP cíclico (AMPc), espermidina (Spm), RNAt e acetato de amônio (AcAmm). (c) Eficiência da reação quanto à produção da GFP em função da eliminação de AMP cíclico, espermidina, RNAt, acetato de amônio (-4) e eliminação destes mesmos reagendo incluindo T7 RNA polimerase (-4)(-T7). Nomes descritos na figura representam aqueles que foram eliminados da reação; (-), reação controle sem plasmídeo; Controle Positivo, reação com todos os reagentes originais; n = 3; barras de erros representam desvio padrão (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$). Testes *One Way* ANOVA seguido por test *Dunnett* foram realizados, e amostras foram comparadas à reação "Controle Positivo" (a, b) ou à reação "(-4)" (c).

Nota-se que houve uma significativa queda na eficiência de expressão ao se excluir da reação a fosfocreatina, a creatina quinase, o acetato de magnésio e a T7 RNA polimerase. Quedas menos acentuadas foram observadas para o ácido folínico e o glutamato de potássio. Comprova-se portanto que o sistema é totalmente dependente das principais fontes regeneradoras de ATP (CP e creatina quinase), uma vez que os componentes presentes no extrato celular não são capazes de fornecer energia à reação isoladamente (FUJIWARA; NOMURA, 2013). Da mesma maneira, o íon magnésio, imprescindível em diversas vias bioquímicas de tradução proteica, não pode ser eliminado da reação (FUJIWARA; NOMURA, 2013; DOPP; TAMIEV; REUEL, 2019). O ácido folínico também é importante, uma vez que sem ele, o sistema encontraria dificuldades em iniciar a tradução proteica (CAI et al., 2015). Por fim, percebe-se que há também queda significativa de expressão ao se retirar a T7 RNA polimerase. Este resultado era esperado, visto que o extrato utilizado para este teste foi preparado seguindo o Protocolo 1 e, portanto, sem indução endogéna da polimerase por IPTG durante o cultivo celular. Por outro lado, não houve variação estatisticamente significativa nos níveis de expressão da GFP ao se retirar do meio reacional o AMP cíclico, a espermidina, o acetato de amônio e o RNAt, sendo o extrato celular capaz de fornecer essas biomoléculas sem necessidade de suplementação dos mesmos.

Em seguida, decidimos excluir mais de um reagente da reação ao mesmo tempo e verificar o impacto na expressão da GFP (Figura 9 b). Como esperado, ao se eliminar todos os reagentes da solução que não foram capazes de diminuir significativamente os níveis de expressão da GFP, não há alteração no sistema quanto à eficiência de expressão da GFP. Desta forma, a solução energética pode ser utilizada sem a presença de AMP cíclico,

espermidina, RNAt e acetato de amônio, simplificando com isso o processo e diminuindo os custos envolvidos na aquisição destes reagentes. Por fim, decidimos testar a eficiência de expressão da GFP com a solução energética otimizada utilizando desta vez o extrato celular produzido com base no Protocolo 2 (Figura 9 c). Uma vez que neste protocolo houve adição de IPTG durante o cultivo celular, eliminou-se a enzima T7 RNA polimerase da solução energética a fim de se verificar se a produção endógena desta biomolécula pelo próprio extrato seria suficiente para a manutenção da expressão proteica em comparação com o mesmo extrato suplementado com esta proteína.

Não houve alteração significativa na expressão da GFP após eliminação da T7 RNA polimerase do meio reacional. Este resultado comprova a importância de adição de IPTG durante o cultivo celular, uma vez que em extratos produzidos sem adição do indutor (Protocolo 1) não há expressão significativa da GFP (Figura 9 a). A eliminação de T7 RNA polimerase é importante por dois motivos: elimina significativamente os custos da solução energética e/ou reduz o tempo que seria necessário para produção *in house* do composto (SCHWARZ et al., 2007).

Por fim, conclui-se que o nosso sistema de SPLC mantém a expressão de GFP de forma eficiente após otimização da solução energética e alteração no protocolo de produção do extrato celular.

2.3.3 Construção do Plasmídeo e Expressão da ErA

Durante o desenvolvimento deste projeto, trabalhos recentes envolvendo a síntese de ErA em tecnologia de SPLC foram publicados na literatura (WILDING et al., 2019b, 2019a; HUNT et al., 2020). No entanto, é importante destacar que, ao mesmo tempo, importantes avanços científicos foram alcançados neste trabalho. Estes avanção serão aprofundados nesta seção. Iniciaremos detalhando os resultados de expressão com os diferentes plasmídeos contendo o gene da ErA e avançaremos a discussão com a avaliação da atividade enzimática da ErA expressa em nosso sistema de SPLC otimizado.

O desenvolvimento de plasmídeos para sistemas de expressão livre de células baseados em extratos celulares de *E. coli* se assemelha bastante à construção de plasmídeos para expressões convencionais *in vivo*. Como todo sistema de expressão, o gene de interesse

deve estar acompanhado de regiões regulatórias como promotores, sítios de ligação ribossomal e terminadores de transcrição. Plasmídeos comerciais como o pET (Novagen) e o pIVEX (Roche Biosciences) podem facilmente ser utilizados para esta finalidade (SCHWARZ et al., 2007). Estes plasmídeos contém geralmente um forte e específico promotor de transcrição T7, um eficiente terminador de transcrição T7 e um sítio de ligação ribossomal otimizado para altos níveis de expressão proteica.

Como o plasmídeo utilizado inicialmente para expressão da GFP havia sido o pIVEX, decidimos então clonar o gene da ErA neste mesmo plasmídeo e avaliar se a proteína poderia ou não ser expressa. Foi utilizado especificamente o plasmídeo pIVEX 2.4d, que fusiona uma cauda de histidina na porção N-terminal da proteína. Decidimos fusionar a proteína nesta posição, pois ErA funcional com cauda de histidina na porção N-terminal já havia sido previamente produzida e avaliada com sucesso por nosso grupo (WLODARCZYK et al., 2019). Além do mais, os estudos de expressão da ErA em sistemas de SPLC comprovaram posteriormente que a adição da cauda de histidina na porção C-terminal teve um impacto significativamente negativo na atividade enzimática da enzima, atingindo valores de atividade específica na ordem de 1 U/mg (WILDING et al., 2019b, 2019a), enquanto que valores superiores a 300 U/mg foram atingidos após a remoção da cauda de histidina (WILDING et al., 2019b).

O primeiro teste foi realizado utilizando a solução energética original e o extrato produzido com base no Protocolo 1. Além disso, avaliamos a influência da variação da concentração de acetato de magnésio na solução a fim de otimizar a expressão (SCHWARZ et al., 2007) e da ausência ou presença de DTT do meio reacional, a fim de avaliar a importância do ambiente redutor na expressão da ErA (Tabela 4).

Tabela 4. Diferentes concentrações de MgAc e DTT utilizadas para reações de expressão da ErA em sistema SPLC.

Nº Amostra	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
MgAc (mM)	14	16	18	20	14	16	18	20
DTT (mM)	0	0	0	0	3,4	3,4	3,4	3,4

Para análise da expressão, amostras foram coletadas tanto da fração solúvel quanto da fração insolúvel do meio reacional (Figura 10). A expressão da proteína GFP, controle positivo, foi observada nas duas frações de forma significativa. No caso da ErA, a expressão só pôde ser confirmada por *Western blotting,* dado ao seu reduzido nível de expressão. Detecção da ErA foi observada apenas na fração solúvel do meio reacional.

O maior nível de expressão da ErA foi atingido em reações contendo 18 mM de acetato de magnésio e 3,4 mM de DTT (Figura 10 c). Embora a ErA seja uma enzima naturalmente expressa no periplasma, ambiente mais oxidante em relação ao citoplasma (WALKER; GILBERT, 1994) a presença de DTT aumentou os níveis de expressão da enzima. Um dos motivos pode estar relacionado ao efeito estabilizante que o DTT confere à enzima T7 RNA polimerase, facilitando desta forma a síntese proteica (SCHWARZ et al., 2007). Infelizmente, mesmo tendo confirmado a expressão da ErA, não fomos capazes de detectar atividade enzimática diretamente do meio reacional.

Uma vez que os componentes da solução energética e do extrato celular poderiam interferir nesta detecção, decidimos seguir com a etapa de purificação da enzima. De fato, as atividades específicas da ErA obtidas por Wilding et al. foram todas realizadas com a enzima purificada, seja por cromatografia de afinindade ou por cromatografia de troca catiônica (WILDING et al., 2019b). Para a etapa de purificação, a reação de SPLC foi realizada em volume maior (500 µL) e uma coluna de cromatografia por afinidade convencional foi usada para a purificação. Ao final, conseguiu-se obter a enzima em quantidades significantes e com um alto grau de pureza do meio reacional (Figura 11).

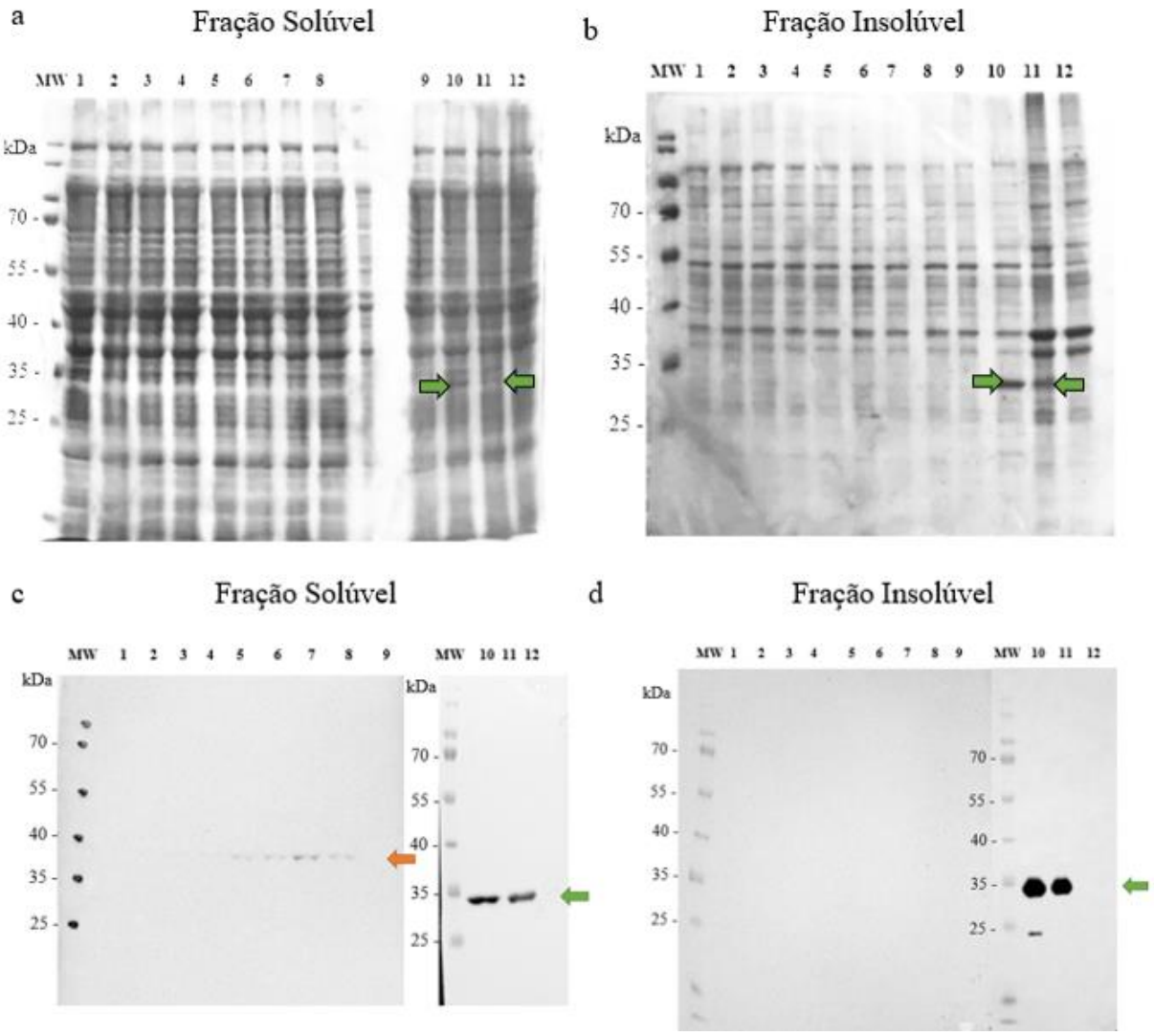


Figura 10. Resultado do SDS-PAGE e *Western Blotting* referente às amostras de proteínas contidas nas frações solúvel e insolúvel das reações de SPLC. (a) SDS-PAGE da fração solúvel. (b) SDS-PAGE da fração insolúvel. (c) *Western Blotting* da fração solúvel. (d) *Western Blotting* da fração insolúvel. MW - Marcador de massa molecular *PageRuler*TM *Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific*TM*)*; 1-8 – Reações contendo plasmídeo com gene *ansB* sob diferentes condições reacionais como descrito na Tabela 4; 9 – Reação controle com extratos obtidos por prensa francesa; 10 – Reação contendo plasmídeo repórter com extratos obtidos por prensa francesa*;* 11 – Reação contendo plasmídeo repórter com extratos obtidos por sonicação. 12 - Reação controle com extratos obtidos por sonicação. Setas verdes indicam bandas de GFP expressas. Seta laranja indica expressão da ErA.

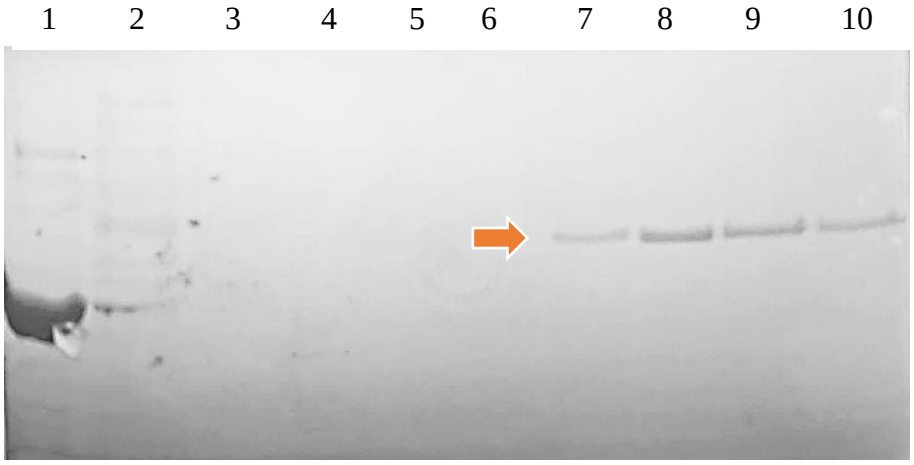


Figura 11. Purificação por IMAC de ErA produzida por SPLC. Resultado do SDS-PAGE corado com Coomassie Blue R-250 da purificação por cromatografia de afinidade da ErA produzida em sistema SPLC. 1 - Amostra purificada de ErA produzida *in vivo* usando células de *E. coli*, usada como padrão; 2 - Tampão de equilíbrio (*flow-through);* 3 - Tampão de lavagem (*flow-through*); 4 – 10 - Amostras coletadas após o tampão de eluição. Seta laranja indica presença da ErA, cujo tamanho é superior à enzima comercial devido à presença da cauda de histidina.

Após a purificação, a enzima foi transferida do tampão de eluição ao tampão de fosfato de potássio, pH 7,0 onde esperava-se que a enzima apresentasse atividade enzimática. No entanto, não foi possível detectar a atividade da ErA após a purificação. Diversas tentativas de troca de tampão foram feitas, mas não houve êxito. Acredita-se que a proteína, apesar de expressa, não foi dobrada da maneira correta ou que a cauda de histidina pudesse de alguma forma afetar a estrutura da enzima. De fato, tentativas de expressão da ErA em sistemas de SPLC contendo cauda de histidina, resultaram em uma diminuição drástica da sua atividade enzimática específica (WILDING et al., 2019b). Para solucionar este problema, um protocolo de reenovelamento da proteína poderia ser seguido (UPADHYAY et al., 2014), mas decidimos construir e testar outros vetores da ErA

Três novos vetores foram propostos: (1) ErA sem cauda de histidina contido no vetor pSB1A2 (Era_pSB1A2); (2) ErA com cauda de histidina na porção C-terminal contido no vetor pIVEX 2.3d (ErA_pIVEX2.3d) e (3) ErA com cauda de histidina na porção N-terminal, mas desta vez contido no vetor pET15b e não no vetor pIVEX 2.4d (ErA_pET15b), como anteriormente.

Como o intuito era avaliar se a expressão *in vitro* da enzima era, não apenas capaz de expressar a enzima, mas também de produzí-la com atividade enzimática, decidimos avaliar a eficiência da proposta por meio da quantificação da atividade enzimática diretamente do meio reacional. As atividades enzimáticas da L-ASNase em outros trabalhos só foram realizadas ou com a enzima purificada (WILDING et al., 2019b, 2019a) ou por meio de outros métodos mais complexos que não envolvem o uso direto de reagentes colorimétricos padronizados (HUNT et al., 2020). Mensuração da atividade asparaginásica diretamente do meio reacional favoreceria enormemente a avaliação dos níveis de expressão da enzima, uma vez que a etapa de purificação não seria necessária, equiparando-se desta forma à utilização da GFP como uma proteína repórter. Infelizmente, nos primeiros testes, não foi detectada atividade enzimática em reações contendo os vetores ErA_pSB1A2 e ErA_pIVEX2.3d (Figura 12).

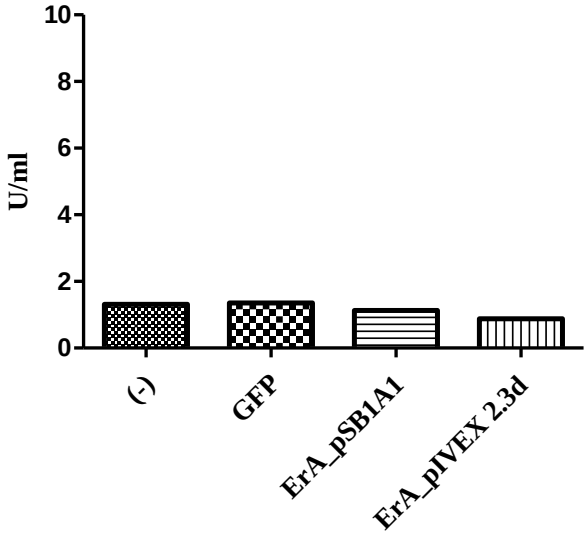


Figura 12. Atividades enzimáticas da ASNase resultantes de reações de SPLC usando diferentes construções plasmidiais. Atividade enzimática mensurada para os vetores contendo o gene da ErA (ErA_pSB1A2 e ErA_pIVEX 2.3d) não foram maiores em relação às reações controle, i.e. sem plasmídeo (-) ou com plasmídeo contendo o gene da GFP. n =1.

No caso do vetor ErA_pIVEX 2.3d, houve expressão da enzima (Figura 13 a), mas ela não apresentou atividade enzimática (Figura 12); no caso do vetor ErA_pSB1A2 não houve atividade enzimática, porque não houve expressão da proteína a partir deste plasmídeo (Figura 13 b). Curiosamente, o único plasmídeo que foi capaz, tanto de expressar a enzima como

produzí-la com atividade enzimática, foi o ErA_pET15b (Figuras 13 b e 14). Assim como o plasmídeo utilizado originalmente para expressão da ErA, o ErA_pET15b também fusiona uma cauda de histidina na porção N-terminal. A diferença entre os dois vetores reside unicamente no sítio de clivagem existente entre a cauda de histidina e o domínio da proteína. Enquanto no plasmídeo pIVEX 2.4d há um sítio de clivagem para o fator Xa, no plasmídeo pET15b existe o sítio para reconhecimento da trombina. Mesmo as sequências das partes regulatórias (i.e. promotor, RBS e terminador de transcrição) são idênticas entre ambos. Essa pequena diferença na sequência de clivagem teria portanto permitido a expressão da ErA com atividade.

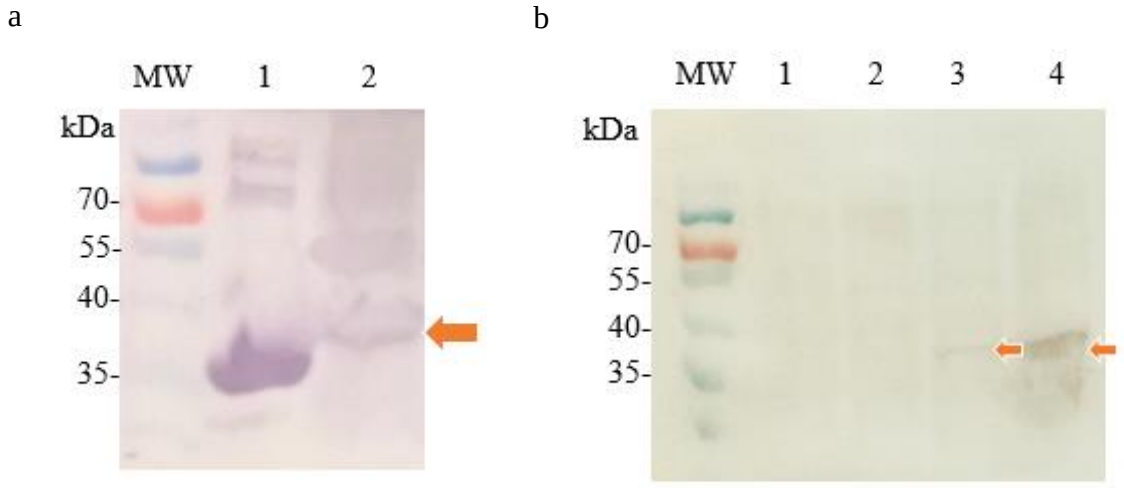


Figura 13. *Western blotting* de diferentes reações de SPLC contendo diferentes contruções plasmidiais como DNA molde. (a) *Western blotting* da reação de SPLC contendo o plasmídeo ErA_pIVEX2.3d, com cauda de histidina na posição C-terminal. MW - Marcador de massa molecular *PageRuler*TM *Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific*^{TM}*)*; 1 - Amostra de purificada de ErA produzida *in vivo* em *E. coli*; 2 – Porção solúvel da reação de SPLC contendo plasmídeo ErA_pIVEX2.3d. Seta laranja indica banda da ErA com cauda de histidina na posição C-terminal. Anticorpo primário anti-ErA foi utilizado. (b) *Western blotting* da porção da reação de de SPLC contendo os plasmídeo ErA_psB1A2 e ErA_pET15b. MW - Marcador de massa molecular *PageRuler*^{TM} *Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*^{TM}); 1 - Reação controle (sem plasmídeo), utilizando extrato celular produzido de acordo com o Protocolo 1; 2 – Reação com plasmídeo ErA_pSB1A2, utilizando extrato celular produzido de acordo com o Protocolo 1; 3 – Reação com plasmídeo ErA_pET15b, utilizando extrato celular produzido de acordo com o Protocolo 1; 4 – Reação com plasmídeo ErA_pET15b, utilizando extrato celular produzido de acordo com o Protocolo 2 e com solução energética otimizada. Setas laranjas indicam bandas da ErA com cauda de histidina na posição N-terminal. Anticorpo primário anti-ErA foi utilizado.

A avaliação da atividade enzimática da ErA foi feita diretamente na reação de SPLC, não sendo necessário portanto a purificação da mesma (Figura 14). Reação apresentou atividade enzimática de 7,07 ± 0,68 U/mL, valor este significativamente superior a reação controle (1,83 ± 0,14 U/mL). Desta forma, pode-se concluir a partir dos resultados obtidos que o nosso sistema de SPLC é capaz de sintetizar ErA com cauda de histidina na porção N-terminal e atividade enzimática mensurável diretamente na reação. Diferentemente dos demais trabalhos, esta é a primeira evidência de expressão e caracterização da ErA com atividade asparaginásica significativa contendo cauda de histidina fusionada à proteína (o que favorecerá futuros trabalhos de purificação) e quantificada diretamente da reação de SPLC.

Para os posteriores testes de atividade enzimática contendo diferentes soluções energéticas, utilizamos o extrato celular produzido a partir do Protocolo 2. A escolha se deve ao fato de que a nossa solução energética havia sido otimizada para expressão da GFP utilizando como base extratos obtidos por este protocolo (Figura 9 c) e, por isso, gostaríamos de avaliar se a mesma suplementação energética também seria capaz de manter os níveis de expressão de ErA. Além disso, como observado nos resultados de *Western blotting*, níveis de expressão maiores de ErA foram obtidos quando utilizados extratos obtidos através deste protocolo (Figura 13 b).

Inicialmente, foram realizados testes com a solução energética original, mas acrescido de dois novos componentes: IPTG e DTT. IPTG foi adicionado, pois acreditamos que a presença do repressor *lac* na região promotora do plasmídeo pET15b dificultaria a expressão proteica. A molécula de IPTG passaria então a se ligar ao repressor e induziria a expressão por T7 RNA polimerase. Isso deixaria o operador *lac* livre, permitindo com isso a transcrição do RNAm sob regulação do promotor T7 presente no plasmídeo (LEHNINGER et al., 2005). Por outro lado, a adição do DTT foi baseada nos primeiros testes de otimização da solução energética (Figura 10 c).

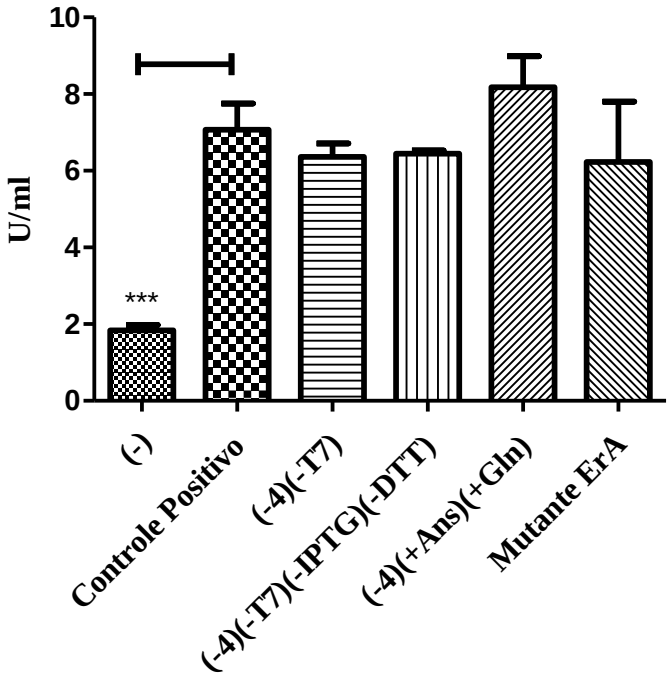


Figura 14. Atividade enzimática da ErA em diferentes reações de SPLC. Para todas as reações, extrato celular produzido de acordo com o Protocolo 2 foi utilizado. (-), reação controle sem plasmídeo; Controle Positivo, reação com todos os reagentes originais da solução energética; (-4)(-T7) reação sem AMP cíclico, espermidina, RNAt, acetato de amônio e T7 RNA polimerase; (-4)(-T7)(-IPTG)(-DTT), reação sem os reagentes citados anteriormente e sem DTT e IPTG; (-4)(+Asn)(+Gln), reação sem AMP cíclico, espermidina, RNAt e acetato de amônio, mas com suplementação de 20 mM de asparagina e 20 mM de glutamina; Mutante ErA, reação com plasmídeo pET15b contendo gene mutante da ErA; n = 3; barras de erros representam desvio padrão (***, $p < 0,001$). Testes One way ANOVA seguido do teste *Dunnett* foram realizados e amostras foram comparadas à reação "Controle Positivo".

A eliminação de espermidina, acetato de amônio, AMP cíclico, RNAt e T7 RNA polimerase não afetou a eficiência de produção de ErA (Figura 14). O resultado se assemelha ao observado para a GFP, onde a eliminação desses cinco componentes também não impactou a sua síntese (Figura 9 c). Da mesma maneira, a eliminação de IPTG e DTT do meio reacional, também não diminuiu a eficiência do sistema, ou seja, não houve mudança nos valores de atividade enzimática do meio reacional (Figura 14). Desta forma, conseguimos simplificar significativamente o número de reagentes químicos necessários para a produção da solução energética. Após a eliminação de reagentes não essenciais, e a indução do extrato por IPTG, o que permitiu que pudéssemos eliminar a enzima T7 RNA polimerase da reação,

conseguimos produzir uma solução, capaz de sintetizar tanto GFP quanto ErA ativa, contendo apenas 8 reagentes (aminoácidos, nucleotídeos, HEPES, ácido folínico, CP, creatina quinase, glutamato de potássio e acetato de magnésio), uma redução de 33% em relação ao número de reagentes utilizados para a síntese de ErA publicado recentemente (HUNT et al., 2020).

Wilding et al. demonstraram que a suplementação de L-asparagina seria capaz de aumentar a síntese da enzima (WILDING et al., 2019b). Posteriormente, eles quantificaram também o efeito da da suplementação da solução energética com o aminoácido L-aspartato na eficiência de expressão da ErA, e verificaram que um aumento de 72% nos níveis de expressão poderia ser alcançado (HUNT et al., 2020). Uma vez que a ErA é capaz de depletar a L-asparagina do meio, e que o sistema de SPLC não é robusto o suficiente para repor a diminuição de concentração deste aminoácido, decidimos suplementar nossa solução com L-asparagina a fim de aumentar o aporte deste componente para a síntese de ErA. Além disso, como a ErA também possui atividade glutaminásica (COSTA-SILVA et al., 2020), decidimos suplementar o meio com uma quantidade adicional de glutamina. No entanto, mesmo com a suplementação de ambos os aminoácidos, não houve variação significativa nos valores de atividade enzimática do sistema (Figura 14).

De qualquer forma, é importante destacar que, entre os reagentes da solução energética que conseguimos eliminar sem alterações significativas na eficiência de expressão da ErA, destaca-se a importância da eliminação do acetato de amônio. Como um dos nossos objetivos é a mensuração da atividade asparaginásica diretamento do meio reacional, a presença de altas concentrações de amônia no meio, interferiria na quantificação da atividade enzimática pelo método de Nessler (COSTA-SILVA et al., 2020). Eliminar amônia do meio implica em aumentar a sensibilidade de detecção da atividade da ErA na reação, a partir da quantificação de amônio produzido *exclusivamente* pela atividade da ErA. Com isso, seria possível detectar a presença da ErA mesmo essa tendo sido expressa em concentrações mais baixas, ou com atividade enzimática reduzida. Isto facitaria o desenvolvimento de novas proteoformas mutantes uma vez que seria possível quantificar com mais precisão a atividade enzimática diretamente da reação, sem necessidade de purificação do produto obtido.

Pensando justamente nessa possibilidade de utilização do sistema para triagem de proteínas mutantes, resolvemos verificar se o sistema seria capaz de expressar outra variante

do mesmo gene. Testamos a expressão da ErA com mutação na posição 293 (mutação V293M). Assim como a enzima nativa, foi possível detectar atividade enzimática para a mutante (Figura 14). Este resultado demonstra portanto o potencial da técnica em triar diferentes mutantes da enzima. Em outras palavras, seria possível testar uma grande diversidade de variantes da enzima de forma simples e rápida, não sendo mais necessário transformar, inocular e cultivar células para cada variante a ser estudada. De fato, se considerarmos somente o tempo necessário para expressão, o reduziríamos de 2 dias (tempo necessário para produção do pré-inóculo, inóculo, indução, centrifugação e lise celular) para apenas 3 horas (tempo necessário para finalização da reação de síntese *in vitro*).

2.4 CONCLUSÃO

Em resumo, ErA com cauda de histidina foi expressa com atividade enzimática em sistema de SPLC. Embora a enzima não tenha sido purificada (apenas uma versão da ErA sem atividade enzimática com cauda de histidina na posição N-terminal pôde ser purificada), a expressão e atividade enzimática da ErA puderam ser confirmadas dada sua detecção no meio reacional por *Western Blotting* e o fato de apresentar atividade enzimática significativamente superior em relação à reação controle sem a presença do plasmídeo. Proteoforma mutante da enzima também foi possível de ser detectada por ensaio de atividade enzimática.

Protocolos de otimização do extrato celular foram realizados com sucesso. Extratos obtidos por homogeneização em prensa francesa foram capazes de expressar concentrações superiores da proteína repórter GFP em relação a extratos obtidos por sonicação e foram por isso usados para a síntese de ErA. Protocolo de obtenção deste extrato foi simplificado significativamente, onde demonstrou-se não haver mais a necessidade da etapa de diálise do mesmo, além do fato de que a etapa de centrifugação pôde ser realizada a uma velocidade consideravelmente menor.

Por fim, a quantidade de componentes da solução energética foi reduzida significativamente. Exclusão de 7 reagentes (AMP cíclico, espermidina, RNAt, acetato de amônio, T7 RNA polimerase, IPTG e DTT) da solução original não implicou em diminuição significativa da atividade enzimática da ErA, a qual foi medida diretamente da reação de síntese proteica *in vitro.* A simplificação dos processos de produção do extrato e da solução energética, tal como seu efeito benéfico na expressão da ErA aqui demonstrados, evidenciam a utilidade da plataforma de SPLC como alternativa biotecnológica para produção da ErA.

3 CAPÍTULO II – BIOCONJUGAÇÃO DA L-ASPARAGINASE EM BACTERIÓFAGOS

3.1 INTRODUÇÃO

Tecnologias de apresentação em bacteriófagos têm sido usadas como plataformas para o estudo de inúmeras interações biológicas. Neste tipo de sistema, tanto peptídeos como proteínas podem ser expressos na superfície de um bacteriófago e então submetidos à ligação com o seu respectivo alvo biológico. A possibilidade de correlacionar o genótipo do bacteriófago com o seu fenótipo (i.e. o peptídeo ou proteína exposta na superfície da partícula viral), permitem que grandes estudos de HTS possam ser implementados, permitindo, por exemplo, a descoberta de potenciais fármacos ou a elucidação de importantes interações biológicas (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

A linhagem de bacteriófago M13 é um dos sistemas mais utilizados. Sua estrutura viral é composta por 5 diferentes proteínas de capsídeo (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX), todas codificadas pelo seu genoma viral de fita única de DNA. As proteínas pIII e pVIII são as mais usadas em técnicas de apresentação de peptídeos/proteínas. Cada bacteriófago contém 5 cópias da proteína pIII e até 2.700 cópias da proteína pVIII. Bibliotecas de peptídeos ou proteínas podem ser facilmente expressas na superfícies da proteína pIII, sendo esta proteína uma importante ferramenta nas técnicas de apresentação, enquanto que expressão de sequências peptídicas maiores na proteína pVIII é usualmente mais difícil e menos eficiente (MALIK et al., 1996).

Apresentação de proteínas de alta massa molecular, como a ErA, na estrutura de bacteriófagos, poderia trazer grandes benefícios. Uma delas, seria a possibilidade de triagem de uma vasta biblioteca de variantes de ErA com características bioquímicas e clínicas aprimoradas. Características como maior atividade asparaginásica ou até mesmo menor depuração plasmástica poderiam ser selecionadas a partir de estudos de evolução dirigida envolvendo a criação de mutantes de ErA que estariam por sua vez associadas ao conteúdo genético de bacteriófagos nela associado. No entanto, a adaptação do sistema de apresentação por bacteriófagos para expressão de proteínas complexas e oligoméricas como a ErA não é

trivial. Algumas estratégias envolvendo outras proteínas foram propostas, como a criação de uma biblioteca de bacteriófagos contendo mutações na proteína VIII e capaz de expressar estreptavidina (uma proteína tetramérica) em sua estrutura (SIDHU; WEISS; WELLS, 2000) e o uso de um sistema capaz de ligar enzimaticamente tanto GFP quanto estreptavidina às proteínas de capsídeo do bacteriófago (HESS et al., 2012). Estes estudos, no entanto, não são práticos na medida em que, no primerio caso, não viabilizam a utilização de bibliotecas de mutantes e, no segundo caso, requerem o uso de enzimas específicas durante a reação de conjugação, as quais precisam ser removidas após a reação.

Recentemente, Keeble et al. demonstraram a possibilidade de rápida conjugação de um domínio proteico a bacteriófagos usando um sistema conhecido como *SpyTag/SpyCatcher* (KEEBLE et al., 2017). O sistema consiste na utilização de um par de partes biológicas oriundas da proteína ligadora de fibronectina FbaB, encontrada em linhagens de *S. pyogenes*, composta por *SpyTag* (peptídeo formado por 13 aminoácidos) e *SpyCatcher* (proteína de massa molecular igual a 12 kDa). *SpyTag* é capaz de formar ligação isopeptídica espontânea com *SpyCatcher* em diferentes tampões, pHs e temperaturas (ZAKERI et al., 2012). Esta reação espontânea e covalente poderia então ser aplicada para sistemas de conjugação em bacteriófagos, os quais expressariam tanto *SpyTag* quanto *SpyCatcher* fusionadas à proteína pIII do vírus.

Nós decidimos aplicar o sistema *SpyTag/SpyCatcher* para conjugação da ErA fusionada a *SpyCatcher* a bacteriófagos capazes de expressar *SpyTag* em sua estrutura. Estes estudos foram realizados em colaboração com o Profº Dr. Ratmir Derda, no Departamento de Química da Universidade de Alberta - Canadá. O estágio internacional foi realizado graças ao financiamento oferecido pela FAPESP (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE). Dr. Derda gentilmente ofereceu toda a infraestrutura de seu laboratório e os reagentes necessários. A possibilidade de conjugação da ErA permitiria futuros estudos de triagem de mutantes de interesse a partir do sequenciamento/titulação das partículas virais. Além disso, a associação bacteriófago/ErA permitiria importantes estudos de distribuiçao da ErA em modelos *in vivo* e poderia inclusive ser utilizada em conjunção a plataformas de SPLC, de forma a simplificar ainda mais o processo de síntese e triagem dessas variantes.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Meios de Cultivo

Para transformação de vetores e cultivo de todas as linhagens de bactérias de *E. coli* utililizadas (DH5α, BL21(DE3), 10G (F- *mcrA* Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) *end*A1 *rec*A1 Φ80*dlac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *ara*D139 Δ(*ara,leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L *nup*G λ- *ton*A) e TG1 (K-12 *glnV44 thi-1* Δ*(lac-proAB)* Δ*(mcrB-hsdSM)5*($r_K^-m_K^-$) F′ [*traD36 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZΔM15*])) foi utilizado meio LB contendo 1% (m/v) de triptona, 0,5% (m/v) de extrato de levedura e 1% (m/v) de NaCl. Para meio LB sólido, foram utilizados os mesmos reagentes com acréscimo de ágar bacteriológico a uma concentração final de 1,5% (m/v). Meio tóp agar foi preparado em solução contendo 1% (m/v) de triptona, 0,5% (m/v) de extrato de levedura, 0,5% (m/v) de NaCl, 0,7% (m/v) de agar e 0,1% de $MgCl_2.6H_2O$.

3.2.2 Conjugação Química de Peptídeos/Proteínas em Bacteriófagos

Reagiu-se 10^{12} PFU/mL de bacteriófagos com 1 mM de éster de dibenzociclo-octino-N-hidroxisuccinimidílico (DBCO-NHS) por 45 min a 4°C. Reação foi interrompida através do uso de coluna de dessalinização *Zeba*^{TM} *Spin* (*Thermo Scientific*). Bacteriófagos modificados com DBCO foram misturados com diferentes concentrações de peptídeos/proteínas modificadas com azido em diferentes intervalos de tempo a 4°C. Para a produção de moléculas de RNase A modificadas com azido, reagiu-se 9 mg/mL de RNase A de pâncreas bovino (*Sigma*) com 1 mM de éster de NHS ácido 8-azido-octanoico por 2 hrs em temperatura ambiente, com agitação. A reação foi interrompida com coluna de dessalinização *Zeba*^{TM} *Spin* (*Thermo Scientific*). Todos os produtos foram caracterizados por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), utilizando o equipamento de espectometria de massas *Voyager Elite Maldi* (*AB Sciex*, US). Espectros foram processados utilizando o programa *Data Explorer 4.0*.

3.2.3 Clonagem e Expressão da *SpyCatcher*_ErA

Gene *SpyCatcher* (GenBank JQ478411) foi sintetizado pela *Integrated DNA Technologies* (IDT), amplificado por PCR utilizando os iniciadores *SpyCatcher*_FW e *SpyCatcher*_RV (APÊNDICE A) e clonado no vetor ErA_pET15b no sítio de restrição *NdeI* (clonagem não direcional), culminando na obtenção do vetor contendo o gene para expressão da *SpyCatcher*_ErA. O vetor foi transformado por meio de choque térmico em linhagens de *E. coli* DH5α quimiocompetentes (para fins de amplificação do vetor) e em seguida em linhagens de *E. coli* BL21(DE3) (para fins de expressão proteica).

Para expressão proteica, 20 mL de cultura celular de *E. coli* BL21(DE3) contendo o vetor de interesse em meio suplementado com 50 µg/mL de carbenicilina foi cultivado por 16 hrs e depois diluido 10 vezes em 200 mL de meio LB. Cultivo foi incubado por 1 hr a 37°C a 200 rpm. Expressão da proteína foi induzida por adição de IPTG (concentração final = 1 mM) por 3 hrs a 200 rpm.

3.2.4 Purificação da ErA e da *SpyCatcher*_ErA

Células de *E. coli* BL21(DE3) foram centrifugadas a 3.220 *g* por 20 min a 4°C. *Pellet* foi ressuspendido em tampão de ligação (20 mM fosfato de potássio, 20 mM imizadol e 500 mM NaCl, pH 7,4) e sonicado por 10 min usando pulso constante *ON* por 15 seg com intervalos *OFF* de 45 seg.

Lisado celular foi centrifugado a 4.000 *g* por 20 min e o sobrenadante foi submetido à cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). A amostra foi manualmente carregada com auxilio de bomba peristáltica em coluna de purificação proteica de 5 mL *HisTrap*^{TM} *HP* (*GE Healthcare*). Proteínas ligadas de forma não-específica à coluna foram lavadas com tampão de lavagem (20 mM fosfato de potássio, 200 mM imizadol e 500 mM NaCl, pH 7,4). Tanto ErA quanto *SpyCatcher*_ErA foram eluídas com tampão de eluição (20 mM fosfato de potássio, 500 mM imidazol e 500 mM NaCl, pH 7,4).

3.2.5 Clonagem do Peptídeo *SpyTag* nos Genomas Virais

Sequência de oligos de *SpyTag* degenerados incluindo os sítos de restrição *BsaI* ou *SfiI* (para obtenção dos bacteriófagos *SpyTag*_pIII e *SpyTag*_pVIII, respectivamente) foram sintetizados pela IDT (APÊNDICE A). 200 pmol de cada biblioteca foi anelada com 600 pmol de iniciador *SpyTag*_pIII ou *SpyTag*_pVIII (APÊNDICE A). 25 µM da dupla fita de DNA resultante foi extendida com 15 U de fragmento *Klenow*, 0,4 mM de dNTPs e 1X de tampão NEBuffer^{TM} 2 por 20 min a 37°C e em seguida inativado por calor por 20 min, a 70°C. Dupla fita de DNA extendida foi purificada com kit *Monarck® PCR and DNA Cleanup Kit* (*New England Biolabs®)* seguindo as instruções do fabricante.

1 µg da biblioteca de DNA purificada para construção de bacteriófagos *SpyTag*_pIII e do vetor M13KE foram digeridos com 20 U de *BsaI-HFv2* e 1X de tampão *CutSmart©* por 15 min a 37°C e em seguida inativados por calor por 20 min a 80°C. 20 ng do inserto digerido foi ligado com 100 ng do vetor digerido (razão molar = 24:1) usando 5 Weiss U de T4 DNA ligase (*Thermo Scientific*) em 1X de tampão T4 DNA ligase, em temperatura ambiente por 16 hrs. Uma unidade Weiss (U) é definida como quantidade de enzima capaz de catalisar a conversão de 1 nmol de pirofosfato inorgânico marcado em material adsorvível Norit em 20 min a 37°C, em condições de reação específicas (WEISS et al., 1968).

Para construção de bacteriófagos *SpyTag*_pVIII, 1 µg da respectiva biblioteca de DNA purificada e 450 ng do vetor fth1 foram digeridos com 20 U de *SfiI* e 1X de tampão *CutSmart©* por 60 min a 50°C. O inserto digerido foi purificado com kit *Monarck® PCR and DNA Cleanup Kit* (*New England Biolabs®)* seguindo as instruções do fabricante. Vetor digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,6% e a banda do vetor digerido foi purificada do gel com kit *Monarck® Gel Extraction Kit* (*New England Biolabs®)* seguindo as recomendações do fabricante. Após a purificação, 1,5 ng do inserto digerido foi ligado com 50 ng do vetor digerido (razão molar 4:1) com 5 Weiss U de T4 DNA ligase (*Thermo Scientific*) em 1X de tampão T4 DNA ligase, em temperatura ambiente por 16 hrs.

3.2.6 Seleção de Clones de Bacteriófagos

Para seleção de clones de *SpyTag*_pIII, células *E. coli* 10G eletrocompetentes foram transformadas com 2 µL do produto de ligação utilizando o eletroporador *GenePulser Xcell*™ *Electroporation System*. Células foram rapidamente ressuspendidas em 500 µL de meio SOC e incubadas em *shaker* por 45 min, a 200 rpm, a 37°C. Células foram diluídas 10 vezes em meio LB e 10 µL da solução resultante foi misturada com 200 µL de cultura de *E. coli* ER2738 cultivada por 16 hrs. A mistura foi plaqueada em placas de LB/top agar, que foram incubadas por 16 hrs a 37°C. Placas formadas foram aleatoriamente selecionadas e amplificadas. DNA genômico de fita única foi purificado com kit *QIAprep® Spin M13 Kit* seguindo as instruçoes do fabricante e depois submetido a sequenciamento.

Para seleção de clones de *SpyTag*_pVIII, células *E. coli* 10G eletrocompetentes foram transformadas com 2 µL do produto de ligação utilizando o eletroporador *GenePulser Xcell*™ *Electroporation System*. Células foram rapidamente ressuspendidas em 500 µL de meio SOC e incubadas em *shaker* por 45 min, a 200 rpm, a 37°C. Células foram plaqueadas em placas LB suplementadas com tetraciclina e que foram então incubadas por 16 hrs a 37ºC. Colônias de bactérias foram inoculadas em meio LB líquido suplementado com tetraciclina. DNA foi purificado com kit *QIAprep® Spin Miniprep Kit* seguindo as instruções do fabricante e submetido a sequenciamento.

3.2.7 Amplificação de Bacteriófagos

Linhagens de *E. coli* ER2738 (F´proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(TetR)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5) cultivadas por 16 hrs foram usadas para amplificação de bacteriófagos. Clones de bacteriófagos obtidos de diferentes formas (placas, estoques em glicerol, ou células de *E. coli* 10G transfectadas) foram misturadas com 25 mL da cultura bacteriana de *E. coli* ER2738, esta previamente diluída 100 vezes em meio LB e crescida por 1 hr até a fase de crescimento logarítmica, e incubadas por 5 hrs a 37°C, a 200 rpm. Meio de cultivo foi centrifugado duas vezes a 4.000 *g* por 15 min e 5 mL de solução 30% PEG 8.000 / 3M NaCl foi adicionada ao sobrenadante. Amostras foram então incubadas por 16 hrs a 4°C. No dia seguinte, o precipitado formado contendo bacteriófagos foi coletado

por centrifugação a 14.000 *g* por 30 min. *Pellet* foi dissolvido em 1 mL de tampão PBS e centrifugado mais uma vez a 21.000 *g* por 20 min, de forma a garantir a remoção de debris celulares. Sobrenadante foi então transferido a um novo tubo *eppendorf* e incubado em bloco de aquecimento a 55°C por 10 min. 110 µL de solução 10% de triton X100 foi adicionada à mistura e depois incubada por 1 hr em temperatura ambiente. 1/6 de volume de 30% PEG 8.000/ 3M NaCl foi adicionada à solução; o precipitado foi mantido em gelo por 1 hr. Por fim, a solução foi centrifugada a 14.000 *g* por 20 min e o *pellet* resultante foi então dissolvido em tampão PBS ou solução 1:1 PBS/glicerol para estoque a -20°C.

3.2.8 Síntese de Moléculas Derivadas de 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucina (DON)

Síntese de DON-PEG-Biotina: DON (1,7 mg, 10 µmol) foi dissolvido em 150 µL de 2X $NaHCO_3$ (100 mM, pH 8,5) e misturado com NHS-PEG_4-Biotina (7 mg, 12 µmol) dissolvido em 150 µL de água. A reação ocorreu em temperatura ambiente por 1 hr. Produto foi caracterizado por cromatografia líquida com espectro de massas acoplado (LCMS) e purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Amostras congeladas foram liofilizadas e o produto resultante foi dissolvido em água (APÊNDICE C).

Síntese de DON-Biotina: DON (1,7 mg, 10 µmol) foi dissolvido em 150 µL de 2X $NaHCO_3$ (100 mM, pH 8,5) e misturado com NHS-Biotina (3,8 mg, 11 µmol) dissolvido em 50 µL DMF e 100 µL de água. Reação se sucedeu em temperatura ambiente por 1 hr. O produto foi caracterizado por LCMS and purificado por HPLC. Amostras congeladas foram liofilizadas e o produto resultante foi dissolvido em água (APÊNDICE C).

3.2.9 Conjugação da *SpyCatcher*_ErA a Bacteriófagos

Todas as reações de conjugação foram realizadas em temperatura ambiente por 1 hr. Soluções de bacteriófagos e proteínas foram transferidas a tampão PBS e misturados juntos em proporções específicas (indicadas nas figuras). Concentrações de bacteriófagos e proteínas foram estimadas espectrofotometricamente a 269/320 e 280 nm, respectivamente. Lisados de bactérias (20 mM fosfato de potássio, 20 mM imidazol e 500 mM NaCl, pH 7,4) também

foram transferidos a tampão PBS com coluna de dessalinização *Zeba*^{TM} *Spin* (*Thermo Scientific*).

3.2.10 Estudos *in vivo* e Processamento de Amostras de Sangue

Todos os procedimentos e experimentos envolvendo animais foram realizados usando um protocolo aprovado por *Health Sciences Laboratory Animal Services* (HSLAS), Universidade de Alberta. Protocolo (AUP00002467) foi aprovado de acordo com as diretrizes do *Canadian Council on Animal Care* (CCAC). Mistura contendo tanto $7{,}5.10^{11}$ (primeiro experimento) ou 4.10^{10} PFU/mL (segundo experimento) de cada clone de bacteriófago (conjugado ou não com *SpyCatcher*_ErA) foi filtrada através de filtro de seringa estéril de 0,22 µm. 100 µL da solução filtrada resultante foi injetada em camundongos C57BL/6J. Todos camundongos foram fêmeas, exceto camundongo 1 do grupo controle do segundo experimento. Aproximadamente, 50 µL de sangue foi coletado para cada intervalo de tempo em cada camundongo. Amostras totais de sangue foram centrifugadas por 5 min a 2000 *g* e o plasma resultante foi coletado para análises de sequenciamento/titulação.

3.2.11 qPCR

Amostras contendo bacteriófagos foram misturadas com Taq DNA polimerase produzida *in house*, 0,2 mM dNTPs, 3X SBRY1, 5% v/v DMSO, 0,2 µM iniciador direto NF10, 0,2 µM iniciador reverso 96 (APÊNDICE A) e 1X de tampão *Phusion® HF* (*Thermo Scientific*). Reação de qPCR foi realizada em termociclador C1000 (*Bio-Rad*) utilizando os seguintes parâmetros: primeiro passo a 95ºC por 3 min, segundo passo repetido 35 vezes a 95ºC por 10 seg, 58ºC por 30 seg, 72ºC por 20 seg e 80ºC por 20 seg. Última etapa de fusão de 65 a 95ºC também foi feita. Resultados foram analisados utilizando o programa *CFX Manager*^{TM} (*Bio-Rad*).

3.2.12 Sequenciamento *Illumina*

Amplicons obtidos com o método de qPCR descrito anteriormente foram convertidos a DNAs, compatíveis com sequenciamento pelo sequenciador *Illumina*, por PCR. Cada molde obtido por qPCR foi misturado com Taq DNA polimerase produzida *in house*, 0,2 mM dNTPs, 5% v/v DMSO, 0,2 µM iniciador direto Illumina_FW, 0,2 µM iniciador reverso Illumina_RV (APÊNDICE A) e 1X de tampão *Phusion® HF* (*Thermo Scientific*). Cada iniciador possui uma sequência contendo 4 nucleotídeos variáveis (NNNN), usados para diferenciar diferentes amostras de sequenciamento. PCR foi realizado em termociclador *Eppendorf Mastercycler* usando os seguintes parâmetros: primeiro passo a 95ºC por 3 min, segundo passo repetido 10 vezes a 95°C por 10 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 20 seg e último passo a 72°C por 20 seg. Produtos de PCR foram quantificados baseados em sua intensidade em gel de agarose, purificados e submetidos ao sequenciamento *Illumina*.

3.2.13 Titulação de Bacteriófagos

Concentração de bacteriófagos foi estimada por titulação. Células de *E. coli* ER2738 foram cultivadas em meio LB por 6 hrs até que atingissem crescimento na fase logarítmica. Foram preparadas diversas diluições em LB de bacteriófagos, que foram obtidos de diversas formas (estoques em glicerol, soluções em tampão PBS ou coletados de plasma de camundongos). 10 µL de cada diluição foi adicionada a 200 µL de cultivo celular contendo células de *E. coli* ER2738, e incubadas por 5 min. Células transfectadas foram transferidas a meio top agar aquecido a 55 °C, vortexados, e aplicados em placas LB contendo IPTG/X-Gal. Placas foram incubadas por 16 hrs a 37°C.

Titulação de bacteriófagos também foi feita através da contagem de colônias de *E. coli* TG1 infectadas. Células de *E. coli* TG1 foram cultivadas até a fase logarítmica de crescimento; 196 µL dessas células foram então misturadas com 4 µL de amostras de plasma diluídas 100 vezes em meio LB e então cultivadas por 30 min a 37°C. Desta mistura resultante, 50 µL de células foram plaqueadas em placas LB suplementadas com tetraciclina e incubadas por 16 hrs a 37°C.

3.2.14 Purificação de Conjugados

Purificação de conjugados foi feita por meio da adição de 1/6 de volume de 30% PEG 8.000 / 3M NaCl à reação. Solução resultante foi incubada em gelo por 1 hr e depois centrifugada por 20 min a 14.000 *g* em temperatura ambiente. Sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi então dissolvido em tampão PBS ou solução 1:1 PBS/glicerol para estoque a -20°C.

3.2.15 Ensaio Enzimático

Reação foi realizada seguindo os mesmos procedimentos de quantificação de atividade enzimática de ErA expressa em SPLC (ver item 2.2.10), no entanto com as seguintes modificações: amostra foi incubada por 10 min em tampão Tris HCl pH 8,6 e não por 40 min em tampão Tris HCl pH 7,4. Uma nova curva padrão de $(NH_4)_2SO_4$ foi usada para quantificação da atividade (APÊNDICE B).

3.2.16 Eletroforeses

Amostras de DNA foram analizadas por padrão eletroforético em gel de agarose 1% (1% m/v agarose, 1X *SYBR*™ *Safe DNA Gel Stain* (*Thermo Scientific*), e 1X tampão TAE). Iniciadores e oligos degenerados foram analizados da mesma forma, no entanto a uma concentração de agarose igual a 4%. Tampão TAE (40 mM Tris, 0,11% (v/v) ácido acético e 1 mM EDTA, pH 8,0) foi usado para correr as amostras em eletroforese a 110V.

Análises de expressão proteica, purificação e conjugação foram analizadas pelo padrão eletroforético em géis de SDS-PAGE 10% Bis-Tris. Gel de separação continha: 10% (m/v) acrilamida, 0,27% (m/v) bis-acrilamida, 0,36 M bis-tris pH 6,6, 0,06% (m/v) PSA e 0,0025% (v/v) TEMED. Gel de entrada continha: 4,98% (m/v) acrilamida, 0,13% (m/v) bis-acrilamida, 0,36M bis-tris pH 6,6, 0,08% (m/v) PSA e 0,004% (v/v) TEMED. Amostras foram submetidas a eletroforese vertical em tampão de corrida MES (50 mM MES, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1% (m/v) SDS e 5 mM bisulfito de sódio) a 35 mA. Géis foram corados com solução contendo 0,3% de coomassie blue R-250, 10% metanol e 10% ácido acético; e

descorados com solução aquosa contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético. Foi utilizado padrão de massa molecular *BLUelf*^{TM} *Prestained Protein Ladder* (*GeneDireX*)

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, decidimos investigar duas potenciais estratégias para conjugação de ErA à superfície de bacteriófagos.Tanto uma abordagem química quanto uma abordagem biológica foram investigadas, as quais serão aprofundadas nas próximas seções.

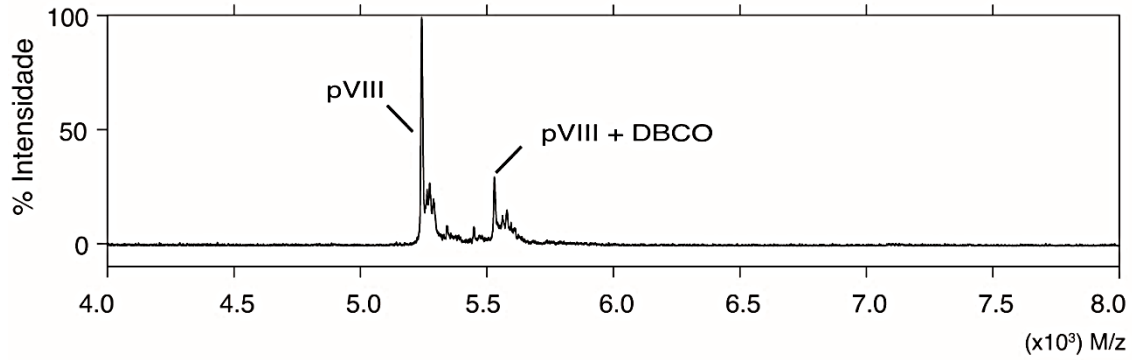
3.3.1 Abordagem Química

Decididimos aplicar uma estratégia química simples conhecida como cicloadição dipolar promovida por tensão (CDPT) (do inglês *strain-promoted dipolar cycloaddition*), já utilizada anteriormente para ligação de uma variedade de moléculas de açúcares a bacteriófagos M13 (SOJITRA et al., 2020). A estratégia é baseada na modificação química de glicanos e bacteriófagos. Glicanos sintéticos são modificados com moléculas de alquil-azido enquanto que a porção N-terminal das proteínas pVIII de bacteriófagos são acilados com DBCO-NHS. Os glicanos modificados são capazes de reagir com os bacteriófagos, formando-se espontaneamente glicanos conjugados a bacteriófagos.

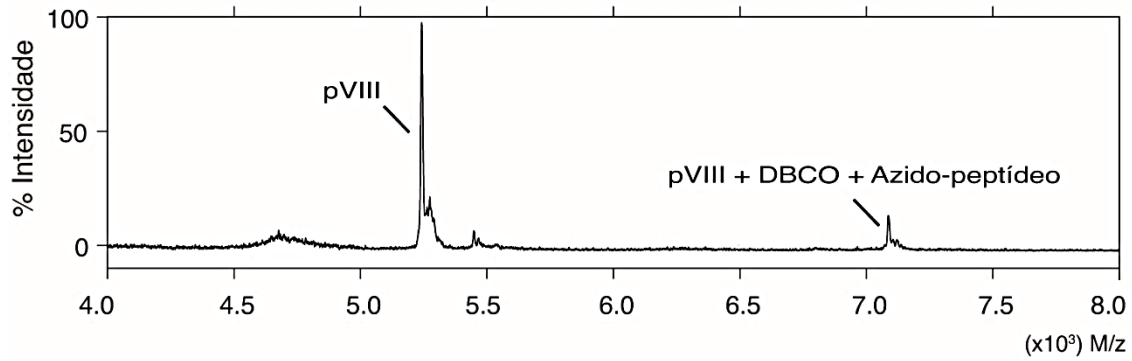
Decidimos avaliar se esta estratégia poderia ser aplicada para proteínas também. Na primeira fase de testes, um peptídeo sintético previamente produzido pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Ratmir Derda foi utilizado como forma de se compreender a cinética da reação química empregada. Posteriormente, a proteína Rnase A foi utilizada como modelo de forma a validar esta estratégia.

O azido-peptídeo “YW-XIII-85” foi utilizado (SGARYCRGDCFDGK)(N3). O peptídeo já inclui a porção azido na posição C-terminal (N3), requerida na reação de CDPT e possui uma massa molecular de 1.557,69 Da. O clone de bacteriófago, denominado de “SVEK” e capaz de expressar na sua superfície a sequência peptídica SVEKNDQKTYHAGGG, reagiu com DBCO-NHS. Por fim, o produto desta reação foi misturado com diferentes concentrações do azido-peptídeo (Figura 15).

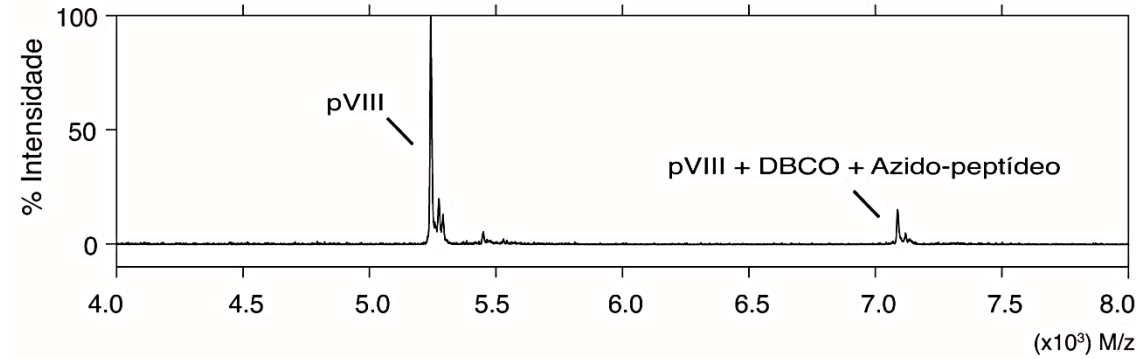
a


100
50
0
% Intensidade
pVIII
pVIII + DBCO
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
(x10³) M/z

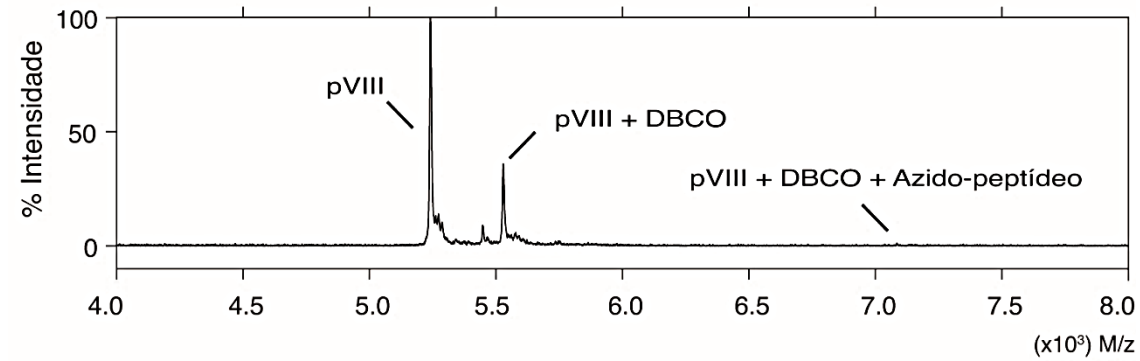
b


100
50
0
% Intensidade
pVIII
pVIII + DBCO + Azido-peptídeo
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
(x10³) M/z

c


100
50
0
% Intensidade
pVIII
pVIII + DBCO + Azido-peptídeo
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
(x10³) M/z

d


100
50
0
% Intensidade
pVIII
pVIII + DBCO
pVIII + DBCO + Azido-peptídeo
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
(x10³) M/z

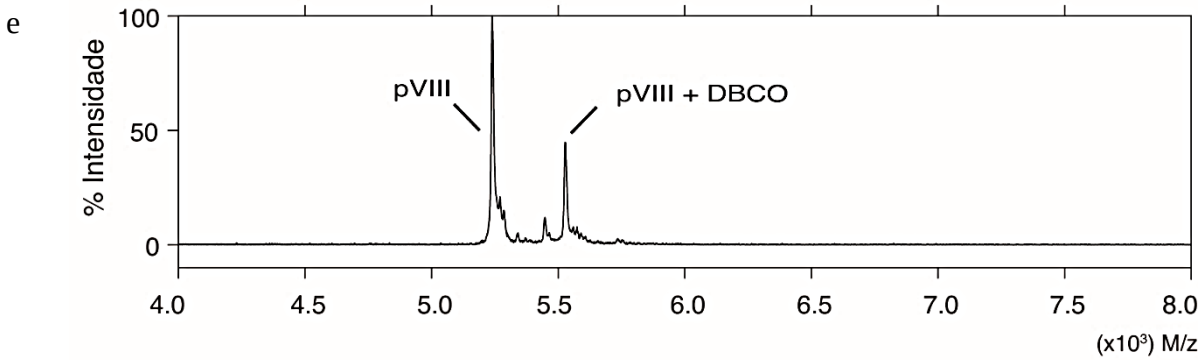


Figura 15. Detecção por MALDI dos conjugados obtidos após reação de conjugação com o azido-peptídeo "YW-XIII-85". Clone de bacteriófago "SVEK" foi modificado com DBCO-NHS e reagiu com diferentes concentrações do peptídeo por 16 hrs. (a) Reação controle – sem peptídeo; (b) 2000 µM de peptídeo; (c) 200 µM de peptídeo; (d) 20 µM de peptídeo e (e) 2µM de peptídeo.

Bacteriófagos modificados com DBCO foram conjugados com o peptídeo com sucesso. Análise do conjugado por MALDI confirmou a presença do pico da proteína pVIII conjugada ao peptídeo (~7.085 m/z), o qual equivale à soma das massas moleculares de cada um dos compostos (pVIII = 5,237 kDa + DBCO = 0,288 kDa + peptídeo = 1,558 kDa = 7,083 kDa). Concentrações de azido-peptídeo equivalentes a 2.000 e 200 µM foram necessárias durante a reação e foram capazes de consumir mais de 90% da proteína pVIII modificada com DBCO depois de 16 hrs, como demonstrado pela diminuição de intensidade do pico (pVIII + DBCO), passando de aproximadamente 30 % a menos de 3% de intensidade (Figura 15 a, b, c). 20 µM de peptídeo não foi capaz de produzir quantidades significantes do conjugado (Figura 15 d), enquanto que 2 µM de azido-peptídeo não resultou em nenhum pico (Figura 15 e). As reações acima apresentadas foram realizadas por 16 hrs, mas resultados similares foram obtidos com longos períodos de incubação (2, 6 e 20 dias) (Resultados não mostrados), comprovando que, pelo menos a partir de 16 hrs, a reação não se altera em função do tempo.

Em seguida, a possibilidade de ligação de uma proteína ao bacteriófago foi testada utilizando a mesma estratégia. RNase A de pâncreas bovino (massa molecular = 13,7 kDa) foi escolhida devido a sua estrutura proteica de baixa complexidade, baixa massa molecular e presença de um pico bem definido por MALDI (Figura 16 a). Inicialmente, RNase A reagiu com éster de NHS ácido 8-azido-octanóico (azido), resultando na formação de múltiplas moléculas de azido-RNAase A (Figura 16 b). Tais conjugados foram formados devido à

reação de moléculas de NHS com diferentes grupos amino presentes na enzima. Grande parte das moléculas de RNase A reagiram com 3 moléculas de azido (massa molecular do ácido 8-azido-octanóico = 0,185 kDa), conjugado este representado pelo maior pico observado no espectro (14.186,7 m/z) (Figura 16 b).

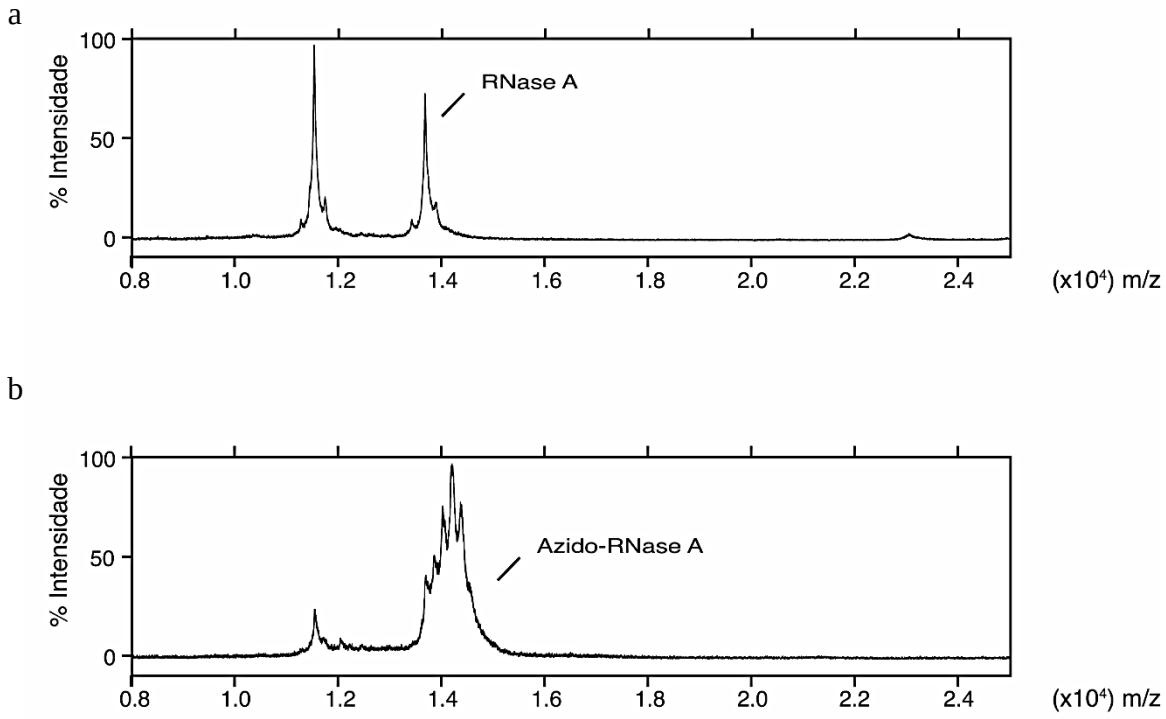


Figura 16. Verificação da modificação de RNase A. Espectro de MALDI da enzima RNase A. (a) RNase A não modificada; (b) RNase A modificada com azido.

Como feito anteriormente com o azido peptídeo, reagimos o clone "SVEK" modificado com DBCO com azido-RNase A. Quando observamos o espectro MALDI na região correspondente ao pico da proteína pVIII (de 4.000 à 8.000 m/z), observa-se o consumo imediato do pico da proteína pVIII modificada com DBCO após reação com a molécula de azido-RNase A (Figura 17 a). O mesmo pico não desaparece após reação do bacteriófago com RNase A não modificado com azido (Figura 17 b). A diminuição de intensidade do pico (pVIII + DBCO) foi observada também em reações envolvendo o clone "SVEK" com o azido-peptídeo "YW-XIII-85" (Figuras 15 b, c), como discutido anteriormente. Além disso,

um pequeno e largo pico foi observado no espectro por volta de 19.595,5 m/z, valor este próximo à soma das massas moleculares da molécula de RNase A (aproximadamente 14,2 kDa) com a proteína pVIII modificada com DBCO (5,5 kDa) (Figura 18). A pequena proporção do conjugado proteico em relação à quantidade de RNase A livre no meio é causada principalmente pelo excesso de RNase A na reação (foram utilizadas 200 µM de RNase A em virtude dos resultados obtidos previamente com o azido peptídeo). Uma vez que a concentração de 10^{12} PFU/mL de bacteriófagos foi utilizada, por volta de 2 µM de proteína pVIII modificada com DBCO (Figura 17 b) esteve disponível para reação com azido-RNase A livre, resultando em uma razão de 1:100 entre moléculas de RNAse A conjugada em relação às moléculas não conjugadas.

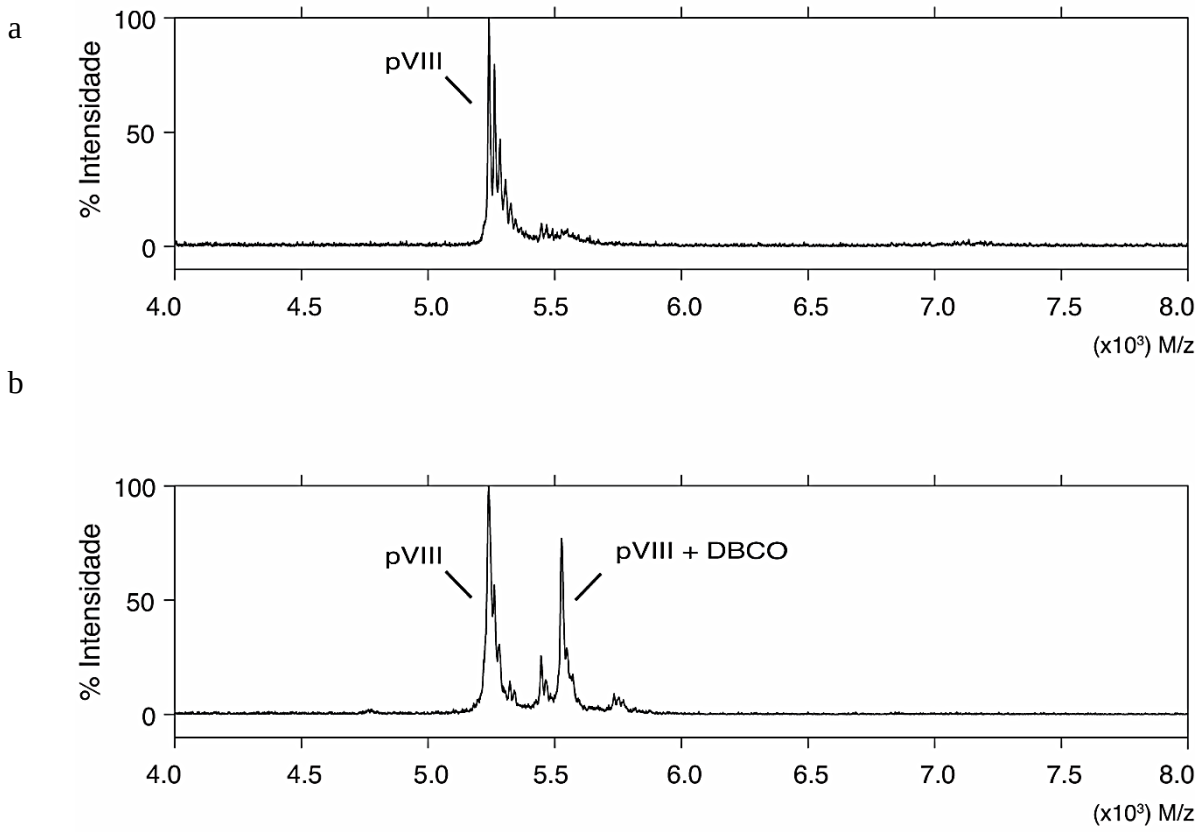


Figure 17. Detecção do consumo da proteína pVIII conjugada com DBCO. (a) Bacteriófago modificado com DBCO e azido-RNase A; (b) Bacteriófago modificado com DBCO e RNase A não modificado.

O uso da ErA aplicando esta abordagem química poderia resultar em diversos problemas. Primeiramente, seria necessário expressar e purificar grandes quantidades da enzima: 200 µM de ErA equivale a 28 mg/mL de enzima. Além da dificuldade em produzir ErA em tão elevadas quantidades, altas concentrações da enzima poderiam ainda provocar problemas de solubilidade. Segundo, a reação da ErA com azido poderia interferir negativamente na atividade enzimática da proteína, uma vez que grupos de aminas primárias presentes na estrutura da ErA poderiam reagir com a molécula de azido, afetando com isso a estrutura e atividade biológica. Como observado nos resultados acima, mais de um sítio da RNase A havia sido modificado com a molécula de azido (Figura 16 b) e, por conta deste problema, um robusto procedimento de optimização seria necessário para que se pudesse controlar quais seriam os sítios de modificação da ErA com a molécula de azido, envolvendo por exemplo, mudanças no pH de reação e nos tempos de incubação.

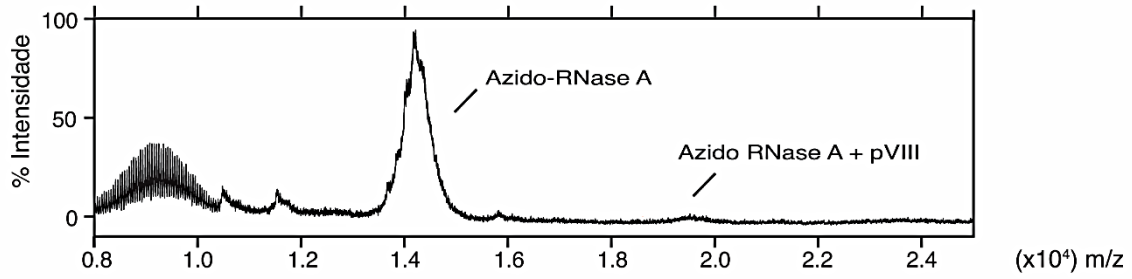


Figura 18. Detecção da conjugação pVIII e RNAse A. Espectro MALDI da proteína Azido-RNase A conjugada à proteína pVIII modificada com DBCO.

Tendo em vista essas observações, uma nova abordagem de conjugação da ErA a bacteriófagos foi desenvolvida em paralelo.

3.3.2 Abordagem Biológica

Zakeri et al. demonstraram que, ao modificar estruturalmente a proteína ligadora de fibronectina FbaB de *S. pyogenes* e dividí-la em duas partes, denominadas de "*SpyTag*" e "*SpyCatcher*", seria possível promover uma ligação peptídica espontânea entre ambas

rapidamente (ZAKERI et al., 2012). Inspirados por este trabalho, decidiu-se implementar de forma racional estas duas partes biológicas dentro do presente projeto. Ao fusionar fisicamente a enzima ErA com a proteína *SpyCatcher* (*SpyCatcher*_ErA) e, ao desenvolver bacteriófagos capazes de expressar o peptídeo *SpyTag* na sua superfície, poderíamos então avaliar a possibilidade de conjugação da ErA a estes bacteriófagos por meio desta abordagem biológica.

3.3.2.1 *SpyCatcher*_ErA

Primeiramente, foi desenvolvido um vetor de expressão contendo o gene da proteína *SpyCatcher* fusionada à porção N-terminal da ErA (APÊNDICES A, D). No nosso grupo de pesquisa, demonstramos que a fusão da cauda de histidina His 6X à porção N-terminal da ErA, sem sua sequência sinal, não afetou significativamente sua atividade enzimática (WLODARCZYK et al., 2019). Levando este resultado em consideração, consideramos que a fusão da proteína *SpyCatcher* na mesma posição teria mais chances de produzir uma proteína de fusão com atividade asparaginásica considerável.

A proteína *SpyCatcher*_ErA foi expressa com sucesso na fração solúvel da porção intracelular de células de *E. coli* BL21(DE3) (Figura 19 a). O tamanho da banda observada no gel de SDS-PAGE correponde à massa molecular do monômero de *SpyCatcher*_ErA (50,6 kDa), um aumento 13,6 kDa comparado à enzima ErA recombinante não fusionada com *SpyCatcher*. Ensaio de atividade enzimática confirmou que a incorporação de *SpyCatcher* na ErA não afetou significativamente sua atividade. Atividade enzimática por mililitro de extrato foi estatisticamente igual entre os extratos ErA e *SpyCatcher*_ErA ($p = 0,14$) (Figura 19 b).

Em seguida, ambas as ErA recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) (ambas as proteínas contém cauda de histidina na porção N-terminal). Utilizando apenas uma única etapa de cromatografia, a ErA recombinante não fusionada com *SpyCatcher* foi purificada com êxito (outras proteínas contaminantes não foram observadas no gel de SDS-PAGE) (Figura 20).

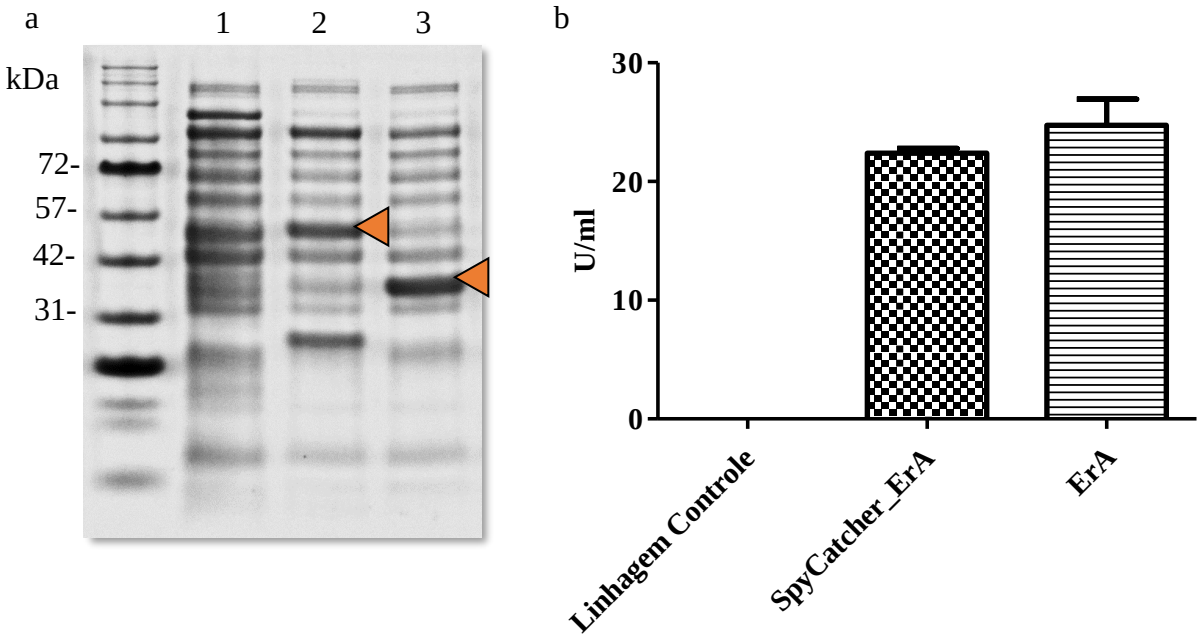


Figure 19. Avaliação da expressão e atividade de ErA e *SpyCatcher*_ErA (a) Gel SDS-PAGE da fração solúvel ; (1) Células de *E.coli* BL21(DE3) sem plasmídeo; (2) Células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o vetor de expressão para *SpyCatcher*_ErA; (3) Células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o vetor de expressão para ErA. Setas laranjas indicam expressão da proteína recombinante *SpyCatcher*_ErA (à esquerda) e da proteína recombinante ErA não fusionada (à direita). (b) Atividade enzimática da fração solúvel de lisados de *E. coli* BL21(DE3). Atividade enzimática entre lisados contendo vetores de expressão para *SpyCatcher*_ErA e ErA é estatisticamente igual (p = 0,14, teste *t* não pareado foi utilizado).

Contudo, bandas extras foram observadas nas frações de eluição referentes à purificação da *SpyCatcher*_ErA (Figura 20), as quais não foram possíveis de serem removidas mesmo após diversas etapas de otimização de purificação ou por meio do aumento no tempo de denaturação proteica e adição de DTT/β-mercaptoetanol/sais caotrópicos durante a preparação de amostras para análise por SDS-PAGE (Resultados não mostrados).

Suspeita-se que ambas as bandas extras observadas estejam correlacionadas a um processo de oligomerização entre monômeros de *SpyCatcher*_ErA, através da ligação do domínio *SpyCatcher* a porções de ErA ou da própria *SpyCatcher* semelhantes ao peptídeo *SpyTag* presentes em outro monômero. De fato, a massa molecular de ambas as bandas correspodem às massas moleculares de dímeros e tetrâmetros de *SpyCatcher*_ErA (101,2 and 202,4 kDa, respectivamente). Alinhamento local entre as sequências de *SpyCatcher*_ErA e

SpyTag revelaram 57,1% de identidade e 85,7% de similaridade entre os resíduos 19 e 25 da *SpyCatcher*_ErA (SHMAMVD) e entre os resíduos 1 e 7 da sequência de *SpyTag* (AHIVMVD) (Figura 21 a).

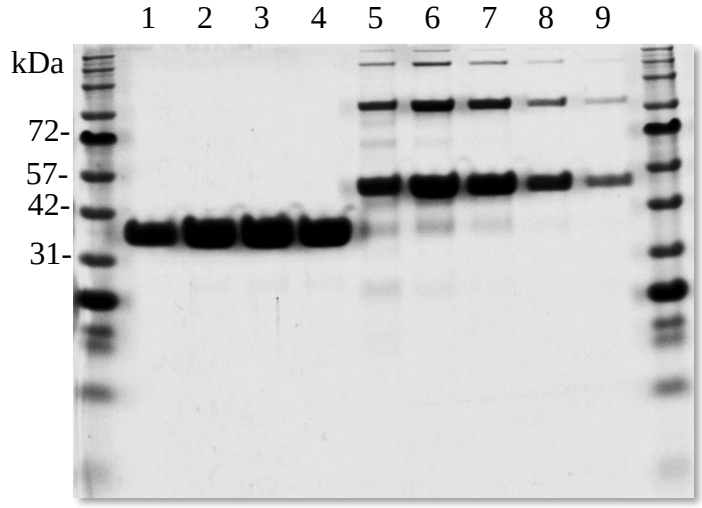


Figura 20. Frações eluídas do processo de purificação por cromatografia de afinidade de ambas as ErAs recombinantes. Números 1 – 4: Frações de eluição da ErA não fusionada. Números 5 – 9: Frações de eluição da proteína de fusão *SpyCatcher*_ErA.

É importante destacar que as sequências similares aqui encontradas fazem parte do domínio *SpyCatcher* da proteína, o que indica uma possível auto-reação entre esses domínios, fenômeno já observado anteriormente para mutantes de *SpyCatcher* (KEEBLE et al., 2017). Por outro lado, ao realizar o alinhamento local usando apenas a sequência do domínio de ErA, revela-se 44,4% de similaridade e 66,7% de identidade entre as sequências 116 e 124 da ErA (VVFVAAMRP) e as sequências 3 a 11 do peptídeo *SpyTag* (IVMVDAYKP) (Figura 21 b). Contudo, diferentemente do primeiro alinhamento, nota-se que o aminoácido aspartato (D) não está presente na sequência da ErA. Este aminoácido é crucial para a formação da ligação peptídica entre as duas partes (ZAKERI et al., 2012), indicando portanto que a reação inespecífica entre os domínios *SpyCatcher* deve ser o real mecanismo envolvido na formação de dímeros/tetrâmeros na reação.

a- *SpyCatcher_ErA e SpyTag*

```
 19 SHMAMVD   25
    :|:.|||
  1 AHIVMVD    7
```

b- *ErA e SpyTag*

```
116 VVFVAAMRP   124
    :|.|.|.:|
  3 IVMVDAYKP    11
```

Figura 21 – Alinhamento local entre as sequências (a) *SpyCatcher*_ErA e *SpyTag* e (b) ErA e *SpyTag*.

3.3.2.2 SpyTag

SpyTag é um peptídeo composto por 13 aminoácidos (AHIVMVDAYKPTK), onde o resíduo Asp^{7} é capaz de receber um ataque nucleofílico do resíduo de Lys^{31} presente na proteína *SpyCatcher*, reação esta catalizada pelo aminoácido Glu^{77} também presente nesta última (ZAKERI et al., 2012). Neste trabalho, decidimos expressar este peptídeo *SpyTag* nas proteínas de capsídeo pIII e pVIII de dois tipos de bacteriófagos filamentosos diferentes, de forma que *SpyCatcher*_ErA pudesse então se ligar biologicamente a ambos os fagos.

Para a expressão de *SpyTag* na proteína pIII (*SpyTag*_pIII) (APÊNDICE A, D), o bacteriófago da linhagem M13, popularmente utilizado na área científica, foi escolhido. Primeiramente, a sequência *SpyTag* foi sintetizada utilizando oligonucleotídeos degenerados, e logo depois clonado no vetor M13KE, de forma que múltiplos clones de *SpyTag* pudessem então ser selecionados posteriormente (Figuras 22 a). A possibilidade de obtenção de múltiplos clones de bacteriófagos, todos capazes de expressar *SpyTag*, viabilizaria, por exemplo, a conjugação de distintas proteínas mutantes a respectivos clones de bacteriófagos pré-determinados, o que, por sua vez, permitiria o estabelecimento de uma relação entre o genótipo do conjugado e o fenótipo observado experimentalmente. Esta estratégia já foi previamente implementada em bacteriófagos modificados com glicanos (TJHUNG et al., 2016).

A sequência de *SpyTag* degenerada foi sintetizada como fita de DNA de fita única, de forma que seus aminoácidos pudessem ser traduzidos por códons diferentes. Para a digestão da sequência e clonagem no vetor M13KE, uma dupla fita da sequência *SpyTag*_pIII foi criada. Após a transformação do produto de ligação e posterior seleção de clones isolados de bacteriófagos, a incorporação da sequência de *SpyTag* no vetor foi confirmada por sequenciamento genético (Figura 22 a).

a

b

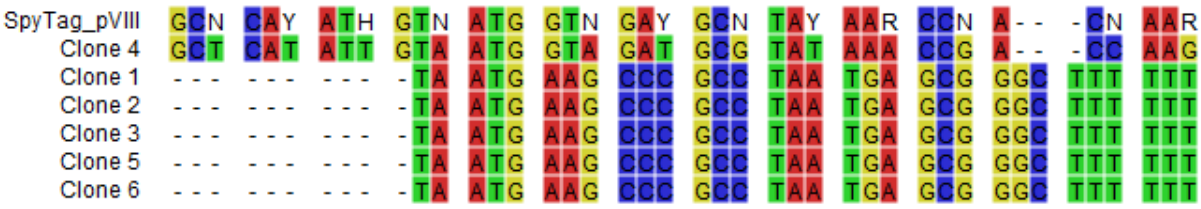


Figura 22. Sequências *SpyTag* degeneradas e de clones selecionados. (a) Sequência de *SpyTag* degenerada e de clones de bacteríofagos *SpyTag*_M13KE selecionados para construção de bacteriófagos *SpyTag*_pIII. (b) Sequência de *SpyTag* degenerada e sequência de colônias de bactérias sequenciadas para construção de bacteriófagos *SpyTag*_pVIII. Sequência *SpyTag* foi detectada somente no clone 4. Para referência, N = qualquer nucleotídeo, Y = C ou T, H = A ou C ou T e R = A ou G.

Para a expressão de *SpyTag* na proteína pVIII (*SpyTag*_pVIII) (APÊNDICE A, D), bacteriófagos filamentosos geneticamente modificados da linhagem fd foram utilizados (ENSHELL-SEIJFFERS; SMELYANSKI; GERSHONI, 2001). A expressão de peptídeos na proteína pVIII segue o modelo de apresentação “88”, onde dois tipos diferentes de proteínas pVIII (nativo e recombinante) são expressos ao mesmo tempo e oriundos de um mesmo vetor de expressão (APÊNDICE D), característica esta que elimina a necessidade de uso de linhagem de fagos auxiliadores e facilita a incorporação de proteínas pVIII recombinantes durante o processo de montagem do capsídeo viral.

Utilizando a mesma estratégia empregada no desenvolvimento do vetor *SpyTag*_M13KE, uma sequência de *SpyTag* degenerada foi sintetizada como fita única de DNA, amplificada como dupla-fita de DNA usando o iniciador *SpyTag*_pVIII (APÊNDICE A) e finalmente digerido e ligado ao vetor fth1. Bactérias foram transformadas com o produto de ligação e selecionadas em placas de LB suplementadas com tetraciclina. Foram observadas 6 colônias de bactérias e apenas uma delas continha o inserto de interesse – o clone 4 (Figura

22 b). DNA obtido desta colônia foi usado para transformação e amplificação do bacteriófago recombinante usando a linhagem de *E. coli* ER2738.

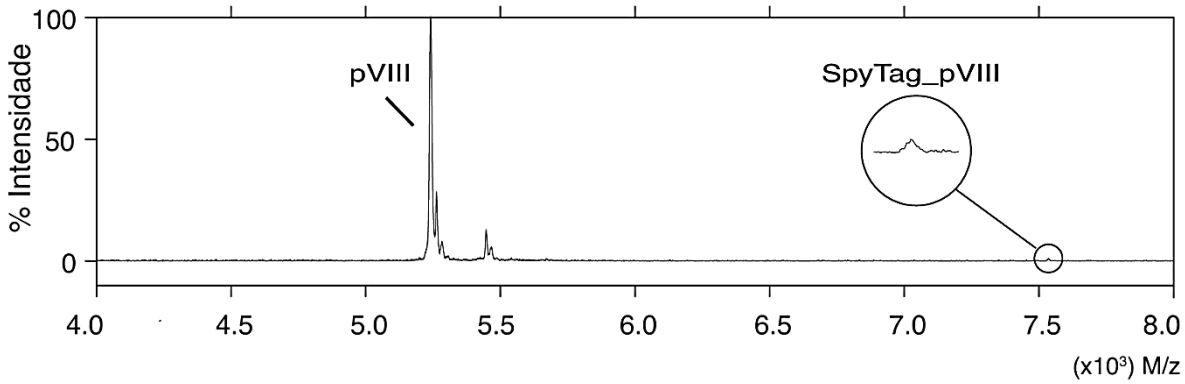


Figura 23. Detecção da proteína recombinante *SpyTag*_pVIII por MALDI. *SpyTag*_pVIII contém o peptídeo *SpyTag* fusionado na posição N-terminal da proteína de capsídeo pVIII. Quantificação da intensidade de banda SpyTag_pVII foi feita usando o programa *Data Explorer 4.0.*

A expressão de *SpyTag* incorporada na proteína recombinante pVIII foi confirmada por MALDI (Figura 23). Massa molecular da *SpyTag*_pVIII (7,5 kDa) é próxima do pico observado no espectro MALDI (7.536,6 m/z). Aproximadamente 1,7% de todas as proteínas pVIII virais continham a mesma proteína fusionada ao peptídeo *SpyTag*. Isto representa por volta de 46 cópias de proteínas pVIII recombinantes expressas, um aumento de aproximante 9 vezes em relação ao número de cópias de *SpyTag* expressos fusionados à proteínas pIII (aproximadamente 5 cópias por bacteriófago). Assume-se 5 cópias de *SpyTag* expressas na proteína pIII porque este é o número máximo de cópias normalmente expressos por bacteriófagos M13. Além disso, diferentemente da construção *SpyTag*_pVIII, não há possibilidade de expressão da proteína pIII sem a sequência *SpyTag*, uma vez que não há duas sequências capazes de expressar a proteína.

3.3.3 Inibidor Suicida da ErA

Em futuros experimentos de seleção de ErAs com maior meia-vida plasmática, métodos capazes de triar apenas aquelas moléculas de ErA biologicativamente *ativas* seriam

essenciais. De nada valeria identificar ErAs estáveis na circulação, mas que fossem incapazes de exercer sua atividade biológica, dada sua inativação, por exemplo, por proteases séricas. Foi pensando neste panorama, que decidiu-se propor paralelamente o desenvolvimento de um novo inibidor suicida de ErA, de modo que este pudesse ser utilizado para a seleção de ErAs biologicamente ativas *in vivo*.

Como ponto de partida, o composto DON foi utilizado. DON é conhecido como um efetivo inibidor de diversas moléculas de L-ASNase, como a L-ASNase de *Pseudomonas* 7A (ORTLUND et al., 2000) e inclusive de ErA (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001), nossa proteína de interesse.

Foram testadas diversas concentrações de DON e avaliados os efeitos na inibição da atividade da ErA. DON foi capaz de inibir significativamente a atividade da ErA quando usada em concentrações entre 100 e 1000 µM. Em concentrações próximas ou menores que a concentração da própria ErA (por volta de 5 µM), nenhum efeito inibitório foi observado (Figura 24).

Uma vez que DON tenha se mostrado efetivo na inibição da atividade da ErA, a síntese de moléculas derivadas de DON que poderiam efetivamente ser usadas para a seleção e o enriquecimento de futuras proteoformas ativas da enzima foram sintetizadas. Ao ligar biotina ao inibidor suicida, formas ativas da ErA poderiam ser selecionadas após ligação dessas moléculas à estreptavidina. Isto seria útil, por exemplo, na concentração de conjugados altamente diluídos presentes em amostras de sangue. Mais importante, apenas moléculas ativas de ErA seriam selecionadas, eliminando com isso a ocorrência de falsos positivos, isto é, a seleção de proteoformas circulantes de alta estabilidade mas biologicamente inativas.

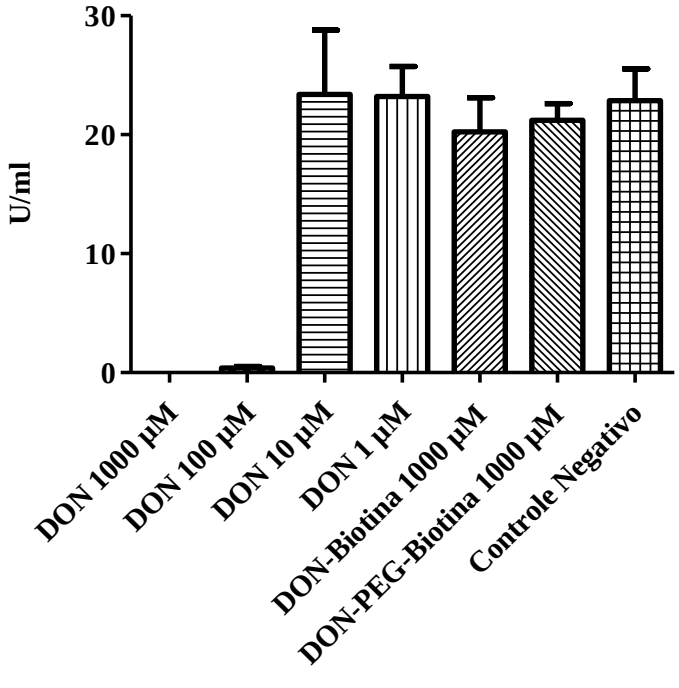


Figura 24. Ensaio de inibição da ErA por DON e derivados. Atividade enzimática da ErA foi quantificada após a introdução de diferentes concentrações de DON, além de moléculas sintetizadas derivadas de DON. Todas as reações foram realizadas a 37°C por 24 hrs, exceto com a molécula de DON-biotina, cuja reação foi mantida por 52 hrs a 37°C.

Infelizmente, ambas as moléculas sintetizadas, DON-Biotina e DON-PEG-Biotina, não foram capazes de inibir a atividade da ErA, mesmo em concentrações relativamente altas (1 mM) e incubadas por longos períodos de tempo (24 e 52 hrs) (Figura 24). De qualquer forma, decidiu-se prosseguir com o projeto de seleção da ErA da corrente sanguínea sem o uso de inibidores suicidas que, em tese, eliminariam a presença de falsos positivos. Por conta disso, assumimos que todas as ErA circulantes seriam ativas, fato este suportado por um recente trabalho desenvolvido por van der Meer et al (VAN DER MEER et al., 2017). Eles concluíram que a eliminação da ErA da circulação sanguinea é causada principalmente pela ação células fagocíticas presentes no fígado, no baço e na medula óssea, ocasionado a acumulação do biofármacos nesses respectivos tecidos.

3.3.4 Conjugação da *SpyCatcher*_ErA a Bacteriófagos contendo *SpyTag*

Conjugação entre amostras de *SpyCatcher*_ErA devidamente purificada e um clone de cada um dos dois bacteriófagos capazes de expressar *SpyTag* foi realizada. Inicialmente, todas as amostras foram transferidas a tampão PBS 1X e a reação foi então realizada por uma hora em temperatura ambiente. A reação foi realizada neste intervalo de tempo, pois estudos prévios indicaram reconstituição máxima entre *SpyTag* e *SpyCatcher* após reação entre 1 µM de ambas as partes incubadas nesse período (ZAKERI et al., 2012). O clone de bacteriófago "SVEK", capaz de expressar o peptídeo controle (SVEKNDQKTYHAGGG) e previamente utilizado em publicações do grupo de pesquisa do Prof. Ratmir Derda (NG et al., 2012; TRIANA; DERDA, 2017), foi utilizado como controle negativo, pois não seria capaz de se ligar ao domínio *SpyCatcher* da proteína *SpyCatcher*_ErA. Reação entre 700 nM de *SpyCatcher*_ErA (o que é equivalente a 2,8 µM de *SpyCatcher* se consideramos o número de moléculas de *SpyCatcher* individuais disponíveis para ligação com *SpyTag* – vale lembrar que *SpyCatcher*_ErA é uma proteína tetramérica) com 3,32 nM de cada clone de bacteriófago resultou na presença de conjugados contendo massa molecular esperada (Figura 25). Estes

serão aqui denominados $(ErA)_5$-pIII para conjugados oriundos da reação entre *SpyCatcher*_ErA e *SpyTag*_pIII e $(ErA)_{50}$-pVIII para conjugados oriundos da reação entre *SpyCatcher*_ErA e *SpyTag*_pVIII.

Reação entre *SpyCatcher* e *SpyTag*_pIII resultou na formação de uma banda com tamanho aproximado de 110 kDa, o que corresponde à soma das massas moleculares do monômero de *SpyCatcher*_ErA (50,6 kDa) e a massa aparente da proteína pIII (60 kDa). Bandas não são observadas no controle negativo usando o clone SVEK. Além disso, a reação da proteína *SpyCatcher*_ErA com *SpyTag*_pVIII resultou na formação de uma banda de aproximadamente 60 kDa que, de fato, é equivalente à soma das massas moleculares do monômero de *SpyCatcher*_ErA e da proteína recombinante pVIII (7,5 kDa). A mesma banda não foi observada na reação controle contendo o clone SVEK.

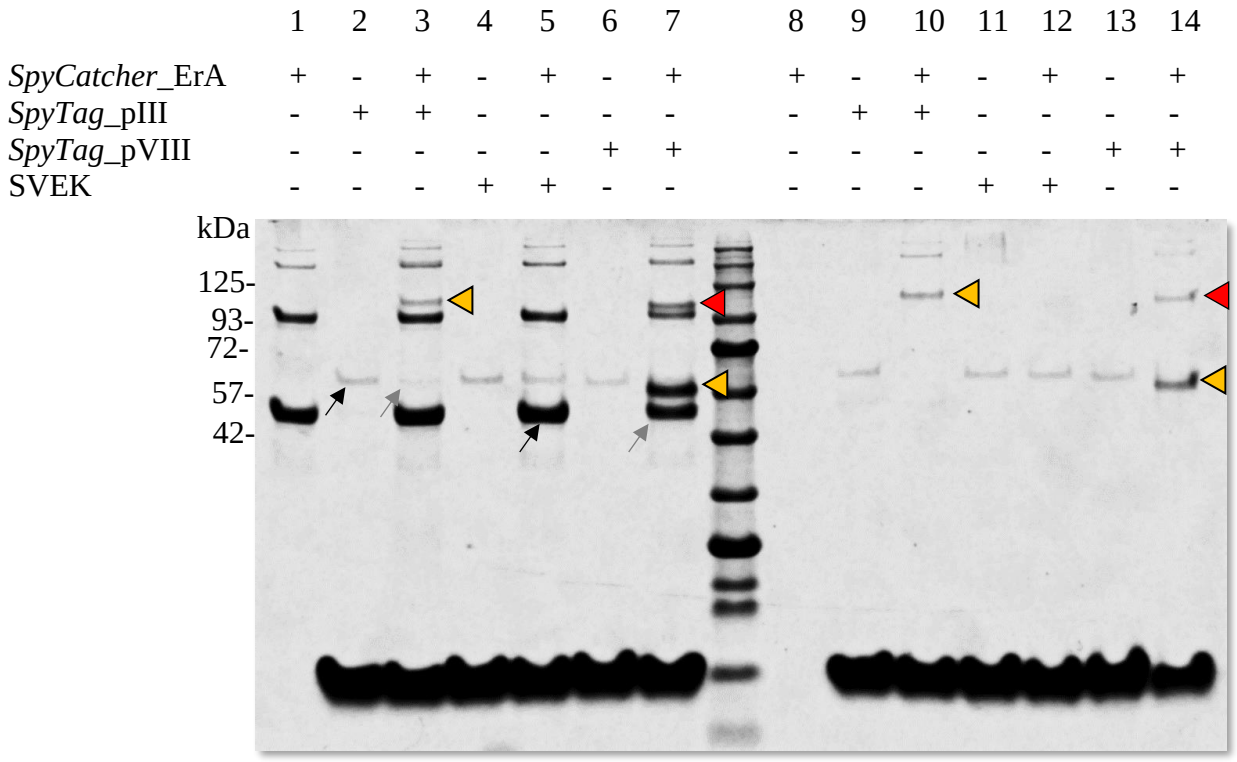


Figura 25. Análise da formação de bioconjugados $(ErA)_5$-pIII e $(ErA)_{50}$-pVIII. Gel de SDS-PAGE das reações de conjugação antes (à esquerda do marcador de massa molecular *BLUelf*™ *Prestained Ladder*, números 1 – 7) e depois da purificação com PEG/NaCl (à direita do marcador de massa molecular *BLUelf*™ *Prestained Ladder*, números 8 – 14). Reagiu-se 700 nM de *SpyCatcher*_ErA (quando presente) com 3,32 nM de cada bacteriófago.

Setas laranjas indicam conjugados criados após mistura da *SpyCatcher*_ErA com os bacteriófagos *SpyTag*_pIII e *SpyTag*_pVIII. Setas vermelhas indicam conjugados entre dímeros de *SpyCatcher* e bacteriófagos. Setas pretas e cinzas indicam consumo das partes biológicas.

Neste mesmo experimento, conjugados entre dímeros de *SpyCatcher* e a proteína recombinante pVIII são observados, fato possivelmente causado pela reação inespecífica entre os domínios *SpyCatcher*. Banda com tamanho aproximado de 110 kDa se apresenta após reação entre *SpyCatcher* e *SpyTag*_pVIII (Figura 25, setas vermelhas).

Mais importante, nota-se através deste mesmo gel, uma ligeira diminuição de intensidade das bandas pIII (Figura 25, números 2 e 3, setas pretas e cinzas) tal como da banda de *SpyCatcher*_ErA (Figura 25, números 5 e 7 setas pretas e cinzas), após reação destes com *SpyTag*_pIII e *SpyTag*_pVIII, respectivamente, confimando portanto consumo dessas partes biológicas durante a reação.

Com o intuito de confirmar se a proteína bioconjugada se manteria ativa mesmo estando ligada a bacteriófagos, uma metodologia simples de separação de bacteriófagos de proteínas não conjugadas foi aplicada (HESS et al., 2012). Para isso, foi adicionado inicialmente PEG/NaCl à reação de conjugação, levando a formação de um precipitado. O mesmo foi centrifugado, o sobrenadante contendo PEG/NaCl foi eliminado, e o *pellet* foi dissolvido no mesmo tampão de reação original. *SpyCatcher*_ErA não conjugado a proteínas virais foi removido com sucesso, confirmado a partir de SDS-PAGE contendo a amostra de *pellet* dissolvida (Figura 25, números 8 – 14). A mistura pôde então ser utilizada para ensaios de atividade enzimática (Figura 26).

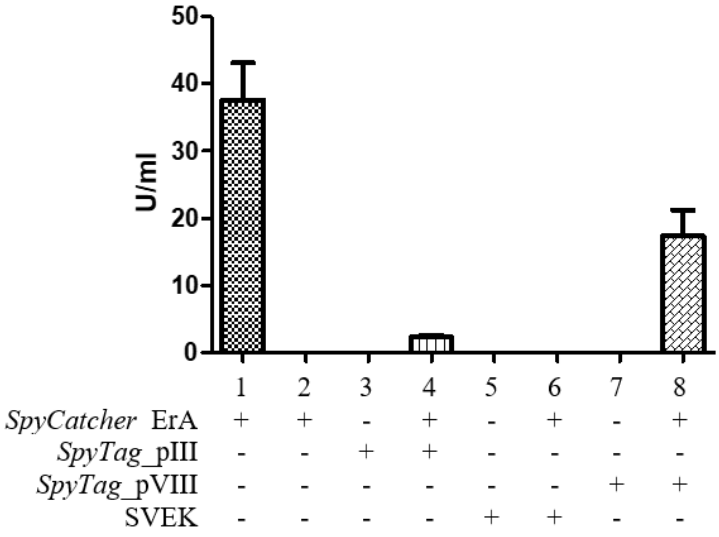


Figura 26. Análise das atividades enzimáticas dos conjugados $(ErA)_5$-pIII e $(ErA)_{50}$-pVIII após reação de conjugação com *SpyCatcher*_ErA purificada. Todas as reações, exceto "1" foram precipitadas com PEG/NaCl e o *pellet* foi posteriormente dissolvido em tampão PBS. Após redissolução do precipitado, atividade enzimática foi observada somente nas amostras "4" e "8", reações onde conjugados de *SpyCatcher*_ErA haviam sido formados.

A atividade enzimática da amostra de 700 nM da proteína *SpyCatcher*_ErA em tampão PBS foi igual a 37,6 U/mL. Após a purificação por PEG/NaCl, aproximadamente 6 e 46% da atividade foi retida nos conjugados formados a partir dos clones *SpyTag*_pIII e *SpyTag*_pVIII, respectivamente. Análise por densitometria indicou uma porcentagem bastante próxima de reconstituição: 3,3% e 45,2% da proteína *SpyCatcher*_ErA livre foi consumida após reação com *SpyTag*_pIII e *SpyTag*_pVIII, respectivamente, após quantificação da razão entre as intensidades de banda do conjugado em relação ao monômero de *SpyCatcher*_ErA (Figura 27). Ao converter atividade enzimática e densitometria em molaridade, é possível quantificar que a concentração de *SpyCatcher*_ErA nos conjugados esteve entre 23 e 42 nM para $(ErA)_5$-pIII e entre 316 e 322 nM para $(ErA)_{50}$-pVIII. Por outro lado, quando calculadas as concentrações de proteína pIII e proteína pVIII disponíveis para a conjugação, nota-se que havia 16,6 e 152,4 nM de proteínas disponíveis respectivamente, valores estes dentro da mesma ordem de grandeza das concentrações de *SpyCatcher*_ErA consumidas. Mais importante, a atividade enzimática em $(ErA)_{50}$-pVIII foi 7,7 vezes maior que em $(ErA)_5$-pIII (ou 14 vezes maior se considerarmos a porcentagem de reconstituição por densitometria). Este valor é próximo à proporção de cópias de *SpyTag* presentes em bacteriófagos fd (1,7% de 2700 pVIII ≅ 50 cópias) em relação a bacteriófagos M13 (5 cópias).

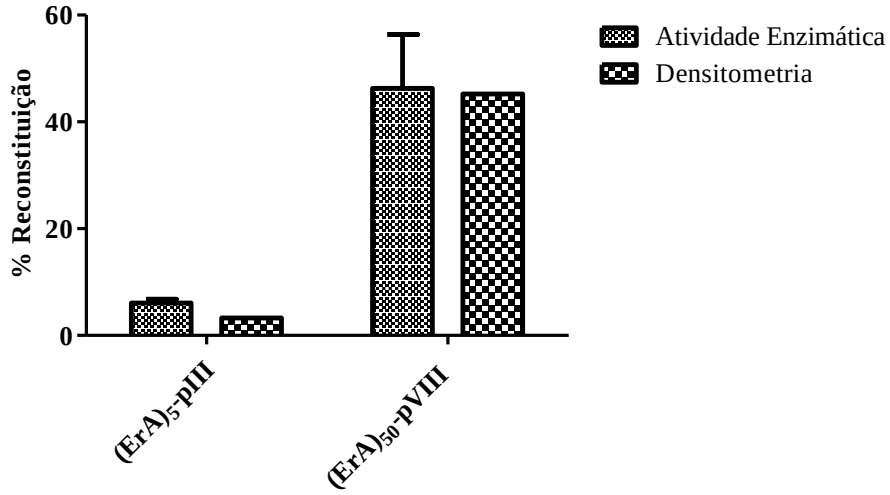


Figura 27. Comparação entre as quantidades formadas de conjugado baseadas em cálculos de densitometria ou atividade enzimática. Para a análise por densitometria, % de reconstituição = (massa molecular do conjugado / intensidade da banda) / ((massa molecular do conjugado / intensidade da banda) + (massa molecular do monômero / intensidade da banda)).

A purificação destes conjugados também foi possível utilizando lisados celulares contendo *SpyCatcher*_ErA não purificada. Para esta finalidade, a mesma concentração de *SpyTag*_pVIII foi utilizada para purificar amostras de *SpyCatcher*_ErA solúvel obtida de lisados celulares de *E. coli* BL21(DE3) (Figura 28 a).

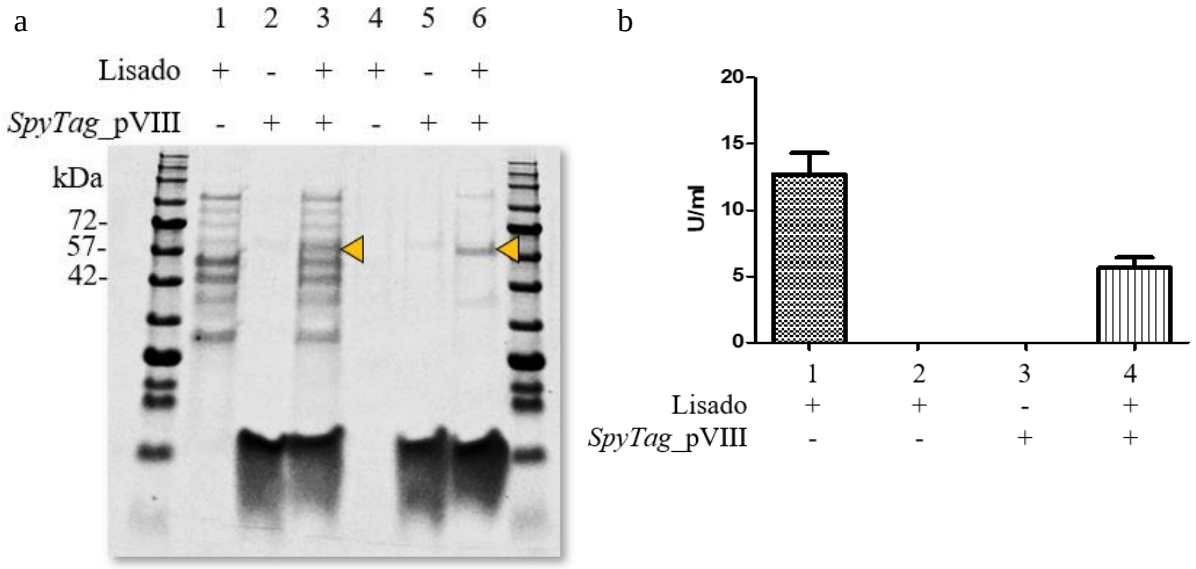


Figura 28. A conjugação de *SpyTag*_pVIII e *SpyCatcher*_ErA não requer de purificação de *SpyCatcher*_ErA. (a) Gel de SDS-PAGE de reações de conjugação utilizando lisados celulares, antes (números 1, 2 e 3) e depois da purificação com PEG/NaCl (números 4, 5 e 6). Reagiu-se 3,32 nM de *SpyTag*_pVIII com o respectivo lisado. Setas laranjas indicam conjugados observados antes e depois da purificação. (b) Análise das atividade enzimática do conjugado $(ErA)_{50}$-pVIII após reação de conjugação no lisado celular. Todas as reações, exceto "1", foram precipitadas com PEG/NaCl e o *pellet* foi posteriormente dissolvido em tampão PBS. Após redissolução do precipitado, atividade enzimática foi observada apenas na amostra "4", onde o conjugado estava presente.

Praticamente nenhuma proteína contaminante foi observada após purificação da *SpyCatcher*_ErA de lisados celulares, comprovando não haver necessidade de purificação da proteína de fusão antes das reações de conjugação propriamente ditas. Precipitação de lisados

com PEG/NaCl na ausência de *SpyTag*_pVIII resultou em solução livre de proteínas (Figura 28 a, número 4), e também ausente de atividade enzimática (Figura 28 b). Por outro lado, atividade enzimática do conjugado $(ErA)_{50}$-pVIII, obtido após sua purificação da reação entre o lisado celular e *SpyTag*_pVIII, foi de aproximadamente 44% em relação à reação original (Figura 28 b).

Estes resultados evidenciam que seria possível inclusive realizar a rápida expressão da proteína de fusão *SpyCatcher*_ErA em sistemas de SPLC, não havendo a necessidade de purificá-la deste sistema pelos métodos convencionais de cromatografia por afinidade ou cromatografia por troca catiônica (WILDING et al., 2019a, 2019b) e diminuindo ainda mais o tempo necessário para obtenção da enzima na sua forma pura. De fato, Khairil Anuar et al. desenvolveram uma técnica similar envolvendo o uso de partes biológicas denominadas *SpyDock* e *SpyTag*. A purificação não envolveu o uso de bacteriófagos, nem precipitação por PEG/NaCl, mas se baseou na possibilidade de conjugação proteica a partir do sistema *SpyCatcher/SpyTag*, permitindo com que proteínas contaminantes pudessem ser removidas (KHAIRIL ANUAR et al., 2019).

3.3.5 Experimentos *in vivo*

Estudos de farmacocinética da L-ASNase dependem basicamente de mensurações da atividade enzimática plasmática da L-ASNase. A atividade enzimática obtida em função do tempo é capaz de informar o tempo de meia-vida deste biofármaco (MARINI et al., 2017). Níveis de detecção acima de 0,1 U/mL são alcançados mesmo após 21 dias de injeção do biofármaco em preparações PEGuiladas do composto. Neste caso, o tempo de meia-vida do medicamento varia entre 5 e 7 dias (DOUER et al., 2007). Formulações não PEGuiladas do medicamento, contendo L-ASNases tanto de *E. coli* quanto de *E. chrysanthemi*, exibem um tempo de circulação mais modesto de 1,24 e 0,65 dias, respectivamente (ASSELIN, 1999).

Os estudos apresentados a seguir tem como objetivo avaliar a possibilidade de identificação da quantidade de ErA no sangue a partir da utilização de conjugados proteico-virais. Comparado a estratégias tradicionais, a ligação da ErA a bacteriófagos permitiria o teste de diversas proteoformas ao mesmo tempo, uma vez que cada variante estaria ligada a

um respectivo código genético (*barcode*) presente no genoma do bacteriófago a ela conjugada. Além disso, níveis relativamente baixos de ErA poderiam ser facilmente detectados na corrente sanguínea, uma vez que a titulação de bacteriófagos é altamente sensível (sendo capaz de detectar uma única partícula viral), além da possibilidade de amplificação e sequenciamento do próprio genoma viral.

3.3.5.1 Sequenciamento de Partículas Virais do Plasma

No primeiro experimento de aplicação dos conjugados *in vivo*, uma preparação contendo uma mistura de bacteriófagos *SpyTag*_pIII e SVEK foram injetados de forma intravenosa em dois grupos de camundongos C57BL/6J. Para o primeiro grupo, foram misturados $7{,}5.10^{11}$ PFU/mL de cada um dos clones de bacteriófagos conjugados com *SpyCatcher*_ErA (reação de conjugação foi realizada misturando-se 3.10^{12} PFU/ml de cada clone com 125 nM de *SpyCatcher*_ErA); para o segundo grupo, denominado de grupo controle, *SpyCatcher*_ErA não foi adicionada.

A amostra foi injetada nos camundongos e as amostras de sangue foram coletadas nos seguintes intervalos de tempo: 15, 30, 60 e 120 min. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas e as amostras de plasma resultantes foram diluídas 10^3 em água e amplificadas por qPCR (Figura 29). Importante salientar que, devido à relativa alta concentração de partículas virais presentes, as amostras de plasma puderam ser altamente diluídas. Aparentemente, a amplificação por qPCR não foi afetada pelos componentes biológicos naturalmente presentes no plasma sanguineo, nessa diluição. No entanto, os valores Cq (isto é, número de ciclos de qPCR onde a fluorescência começa a ser detectada) não apresentaram relação direta com o tempo ou com o grupo de camundongos ao qual as amostras haviam sido extraídas (APÊNDICE E). Em outras palavras, não houve diferença estatística de valores Cq tanto entre os diferentes grupos de camundongos ($p = 0{,}314$), quanto dentro de um mesmo grupo de camundongos em diferentes intervalos de tempo ($p = 0{,}225$).

Uma segunda reação de PCR foi realizada utilizando iniciadores para sequenciamento *Illumina*, os quais contém os adaptadores necessários para detecção por esse equipamento. Todas as amostras de plasma foram amplificadas com sucesso (APÊNDICE F). Bandas de

PCR difusas foram observadas entre 200 e 300 pares de bases, fato este causado pelas diferenças de tamanho entre as sequências *SpyTag* e SVEK contidas em cada um dos clones amplificados. De qualquer forma, a concentração de DNA obtida após estas duas etapas de amplificação (i.e. qPCR e PCR) foi suficiente para a próxima análise por sequenciamento *Illumina*.

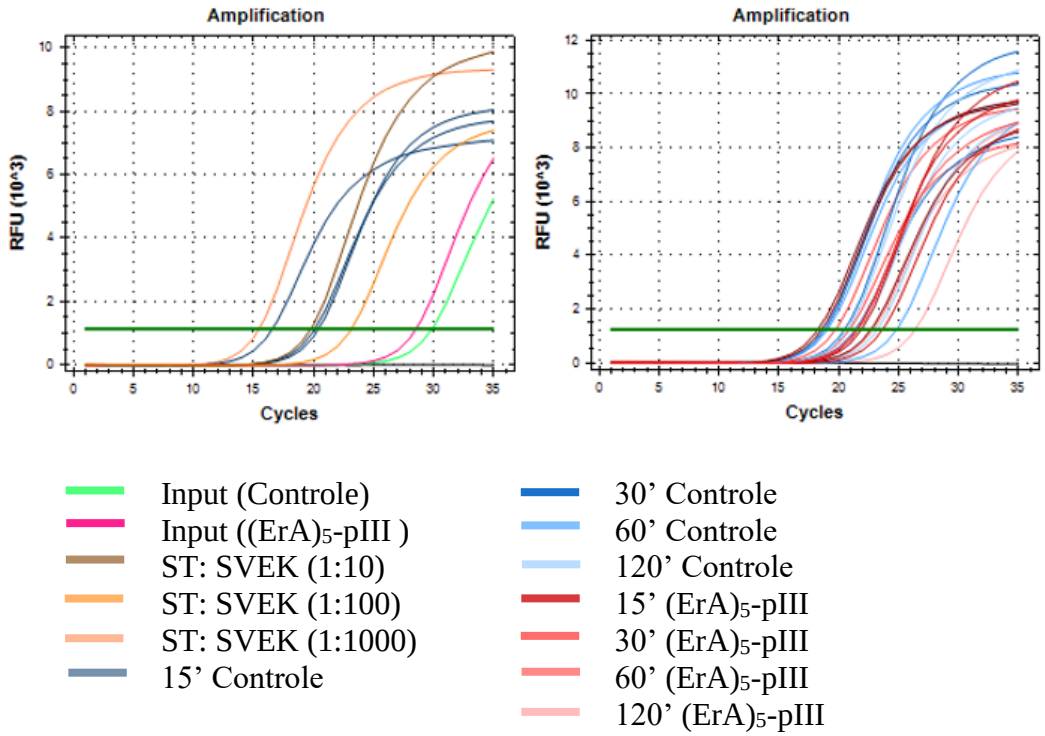


Figura 29. Quantificação da quantidade de partículas virais antes e depois da injeção por qPCR. Amostras *input* são definidas como amostras contendo misturas de bacteriófagos (com ou sem *SpyCatcher*_ErA) usadas no momento da injeção nos camundongos. Além disso, clones de bacteriófagos (ST = *SpyTag*_pIII; SVEK = SVEK_M13) foram misturados em proporções definidas. Curvas azuis e vermelhas representam qPCR de amostras de plasma (diluídas obtidas em diferentes tempos: 15, 30, 60 e 120 min) de camundongos tratados com conjugados ($(ErA)_5$-pIII) ou apenas com bacteriófagos isolados (Controle), respectivamente.

Sequenciamento revelou não haver diferença significativa entre a eliminação dos bacteriófagos *SpyTag*_pIII e SVEK da corrente sanguinea em função do tempo ($p = 0,209$), embora observa-se diferença entre as amostras dos dois grupos de camundongos ($p < 0,005$) (Figura 30). Nota-se que a proporção *SpyTag*_pIII/SVEK foi consistemente menor em camundongos tratados com $(ErA)_5$-pIII conjugados, sendo significativamente diferente nos

intervalos de tempo igual a 5, 30 e 120 min. Isto indica uma concentração mais baixa de $(ErA)_5$-pIII em relação a *SpyTag*_pIII durante todo o experimento, embora não indique uma depuração mais rápida. Além disso, nota-se um inesperado aumento da proporção *SpyTag*_pIII/SVEK no tempo 15 min para todas as três amostras de plasma controle, sendo este fenômeno não observado nas amostras de plasma de camundongos tratados com $(ErA)_5$-pIII.

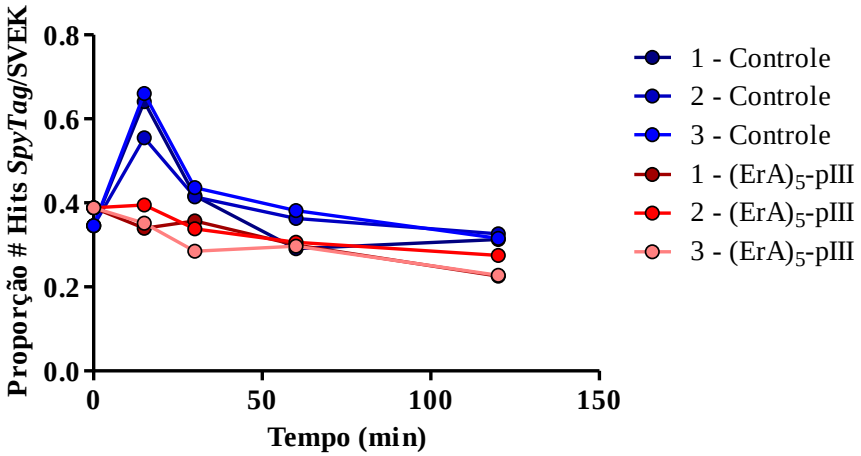


Figura 30. Eliminação de bacteriófagos da corrente sanguinea medido pela proporção do número de *hits* encontrados para cada clone, coletados de dados de sequenciamento *Illumina*. Controle = mistura de clones de bacteriófagos sem adição de *SpyCatcher*_ErA. $(ErA)_5$-pIII = mistura de clones de bacteriófagos contendo *SpyCatcher*_ErA. Análises estatísticas por ANOVA Medidas Repetidas e por teste t independente foram usadas.

A fim de se testar a capacidade do método de sequenciamento *Illumina* em diferenciar variações de concentrações dos clones *SpyTag*_pIII e SVEK, o que permitiria quantificar a taxa de eliminação de proteínas neles conjugados, clones *SpyTag*_pIII e SVEK foram misturados em diferentes proporções *in vitro* (1:10, 1:100 e 1:1000), amplificadas por qPCR e sequenciadas diretamente por *Illumina* (Figura 31). A diferença entre o número de *hits* encontrados para cada clone aumentou, conforme as proporções entre ambos os clones cresceram. O resultado apresentado valida a acurácia de sequenciamento *Illumina* em detectar variações nas concentrações de cada clone, sendo inclusive possível utilizá-lo como curva de calibração para futuras estimativas de proporções entre clones de bacteriófagos.

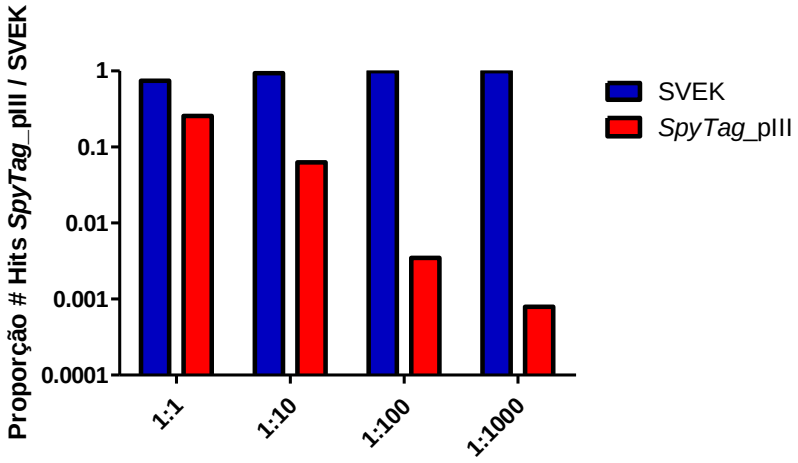


Figura 31. Proporção entre o número de *hits* de *SpyTag*_pIII e SVEK detectados por sequenciamento para cada preparação de clones em diferentes concentrações. Amostras não foram injetadas em camundongos, sendo sequenciadas diretamente da mistura de bacteriófagos *in vitro*.

3.3.5.2 Titulação de Partículas Virais do Plasma

No segundo experimento de aplicação dos conjugados *in vivo*, foram incluídos, além de $(ErA)_5$-pIII, os bacteriófagos $(ErA)_{50}$-pVIII e o clone *SpyTag*_pVIII como controle. Ao grupo de camundongos tratados com conjugados proteico-virais, 2.10^{12} PFU/mL de cada clone de bacteriófago foi misturado com 700 nM de *SpyCatcher*_ErA. Para o grupo controle, a proteína *SpyCatcher*_ErA não foi adicionada.

Amostras foram diluídas para 4.10^{10} PFU/mL, injetadas em camundongos e amostras de sangue foram coletadas nos seguintes tempos: 5, 30, 60 e 120 min. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas de modo a se coletar apenas o plasma sanguineo, o qual foi devidamente titulado para quantificação da concentração de bacteriófagos nele presente (APÊNDICE G). Placas dos clones *SpyTag*_pIII e SVEK puderam ser facilmente observadas, uma vez que estas se apresentaram como placas de coloração azulada e fluorescente, respectivamente. Não houve diferença de eliminação plasmática estatísticamente significante entre os dois grupos ($p = 0,434$) (Figura 32), tal como observado para as amostras analisadas anteriormente por sequenciamento (Figura 30). Contudo, observa-se que a razão *SpyTag*_pIII/SVEK foi significativemente inferior no grupo tratado com $(ErA)_5$-pIII em

relação ao grupo controle ($p < 0,005$). Esta diferença indica que a conjugação da ErA na proteína pIII do capsídeo provavelmente é capaz de interferir negativamente na capacidade do vírus em infectar células bacterias (diminuição da sua infectividade), culminando na diminuição de sua capacidade em produzir placas. De fato, estudos têm demonstrado que modificações na proteína pIII provocam redução dos níveis de infecção (RODI; SOARES; MAKOWSKI, 2002)(HEINIS et al., 2009), o que é de certa forma esperado, uma vez que a infecção de células bacterianas por bacteriófagos filamentosos se inicia com a ancoragem da porção N-terminal da proteína pIII ao pilus bacteriano (SMITH; PETRENKO, 1997).

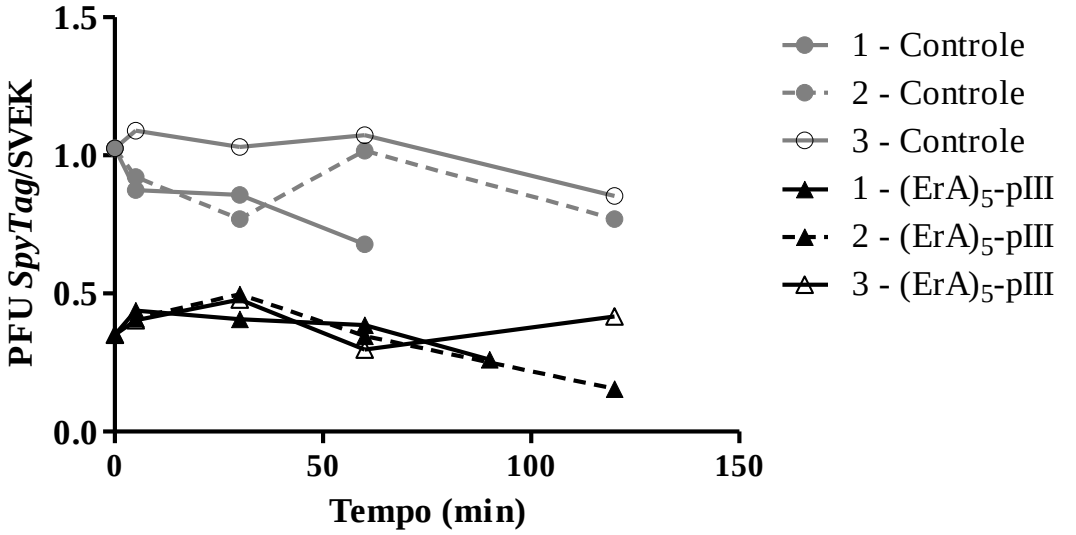


Figura 32. Eliminação de bacteriófagos da corrente sanguinea medido pelo número de placas observadas para *SpyTag*_pIII, SVEK e $(ErA)_5$-pIII. Controle = mistura de clones de bacteriófagos sem adição de *SpyCatcher*_ErA. $(ErA)_5$-pIII = mistura de clones de bacteriófagos contendo *SpyCatcher*_ErA. Análises estatísticas por ANOVA Medidas Repetidas e teste *t*-independente foram usadas, analisando-se do tempo t = 0 ao tempo t = 60 min, ou seja, onde n = 3. Não foi possível coletar amostras de sangue suficientes em t = 120 min nos camundongos "1 – Controle" e "1- $(ErA)_{50}$-pVIII".

Com relação aos clones de *SpyTag*_pVIII (com ou sem *SpyCatcher*_ErA), tivemos problemas em visualizar suas placas concomitantemente com as placas dos demais clones controles. Em relação aos clones *SpyTag*_pIII e SVEK, as placas formadas pela infecção por nossa linhagem de bacteriófagos *SpyTag*_pVIII são menores e não apresentam

coloração/fluorescência. Além disso, durante a titulação do plasma, elas se apresentam em menor quantidade, sendo por isso altamente difícil contabilizá-las.

A fim de se contornar este problema, células da linhagem bacteriana TG1 foram transfectadas com amostras de plasma diluídas e em seguidas plaqueadas em placas de LB suplementadas com tetraciclina. Por meio da contagem do número de colônias resistentes à tetraciclina (apenas o clones *SpyTag*_pVIII possui esse marcador de resistência), seria possível então estimar o número de bacteriófagos presentes nas amostras como unidades formadoras de colônias (CFU) ao invés de unidades formadoras de placa (PFU). A taxa de eliminação da $(ErA)_{50}$-pVIII seria então comparada à amostras de sangue contendo os clones *SpyTag*_pVIII não conjugados à *SpyCatcher*_ErA.

A eliminação plasmática da $(ErA)_{50}$-pVIII foi significativamente superior em relação ao bacteriófago *SpyTag*_pVIII não conjugado à *SpyCatcher*_ErA (Figura 33). A concentração de bacteriófagos *SpyTag*_pVIII conjugados ou não à *SpyCatcher*_ErA foi similar nos primeiros 5 minutos, mas começou a mostrar uma diferença significativa depois deste período ($p < 0,05$). Diferencas estatisticamente significativas de concentração de $(ErA)_{50}$-pVIII relativas ao bacteriófago controle *SpyTag*_pVIII foram observadas nos tempos iguais a 5 e 60 min ($p = 0,02$ e $0,01$, respetivamente). Enquanto que a quantidade total de CFU se manteve constante durante os 120 minutos de experimentos para o grupo controle, todos os camundongos que receberam amostras contendo $(ErA)_{50}$-pVIII, evidenciaram uma maior depuração plasmática deste composto ($p = 0,001$). Esta mesma taxa de depuração não foi observada quando conjugado *SpyCatcher*_ErA a bacteriófagos *SpyTag*_pIII (Figura 32), o que indica que incorporação de múltiplas unidades de ErA a bacteriófagos é capaz de aumentar sua eliminação da corrente sanguinea de forma significativa, pelo menos durante o tempo experimental observado de até 120 minutos.

O aumento da depuração plasmática dos bacteriófagos $(ErA)_{50}$-pVIII em relação aos bacteriófagos $(ErA)_5$-pIII era esperado. O resultado aqui apresentado evidencia um aumento da captação de conjugados proteico-virais por células fagocíticas envolvidas na eliminação da L-ASNase da corrente sanguinea (VAN DER MEER et al., 2017). Essa taxa de eliminação é diretamente proporcional à quantidade de moléculas de proteínas apresentadas por cada partícula viral. Isto é comprovado em estudos envolvendo o aumento da captação mediada por

receptores celulares em função da quantidade de biomoléculas expostas por bacteriófagos ou outras partículas semelhantes a vírus (BANERJEE et al., 2010) (LAROCCA et al., 2001). No caso da L-ASNase, esta depuração é influenciada pela interação do biofármaco a receptores CD14, os quais são conhecidos como marcadores de monócitos/macrófagos. (VAN DER MEER et al., 2017).

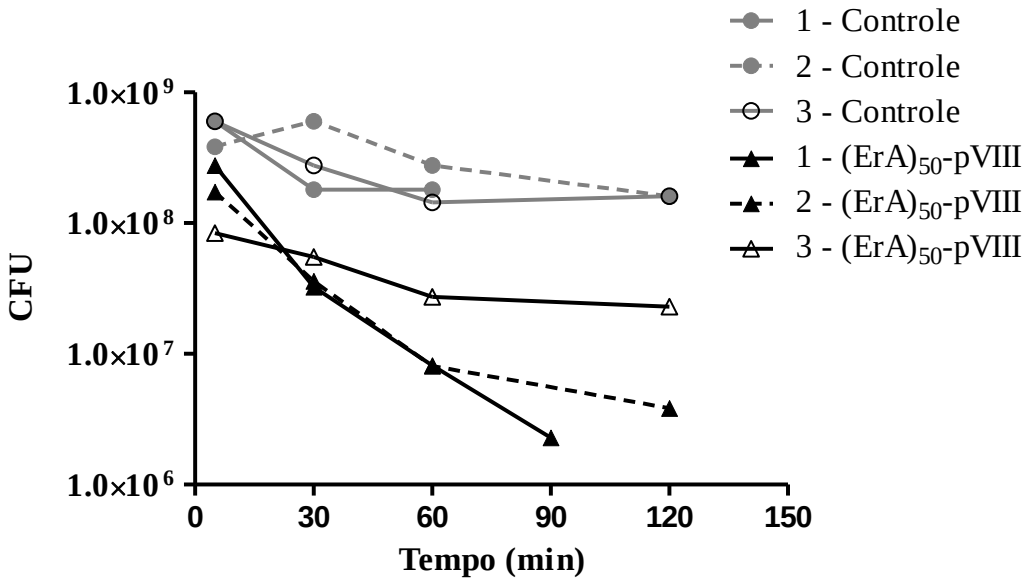


Figura 33. Eliminação de bacteriófagos da corrente sanguinea medido pelo número de colônias resistentes à tetraciclina. Controle = mistura de clones de bacteriófagos sem adição de *SpyCatcher*_ErA. $(ErA)_{50}$-pVIII = mistura de clones de bacteriófagos contendo *SpyCatcher*_ErA. Análises estatísticas por ANOVA Medidas Repetidas e teste t foram usadas, analisando-se do tempo t = 0 ao tempo t = 60 min, ou seja, onde n = 3. Não foi possível coletar amostras de sangue suficientes em t = 120 min nos camundongos "1 – Controle" e "1- $(ErA)_{50}$-pVIII".

A conjugação da ErA, ou de quaisquer outras L-ASNases de interesse clínico, a bacteriófagos, permitira não somente estudos de estabilidade sérica da enzima, mas também de biodistribuição. Uma vez que a quantificação de bacteriófagos por sequenciamento genético, ou mesmo por titulação, não requer uma concentração alta de partículas virais, uma mensuração mais sensível da biotribuição da L-ASNase em diferentes tecidos seria possível. É inquestionável, no entanto, que a conjugação da L-ASNase a bacteriófagos possa alterar significativamente os parâmetros farmacocinéticos do biofármaco. No entanto, é importante frizarmos que a criação de uma biblioteca de mutantes de L-ASNase conjugadas a

bacteriófagos tem como objetivo principal o *estabelecimento de correlações entre os parâmetros bioquímicos das mutantes quando comparadas umas com as outras* (por exemplo, quão estável uma mutante é em relação as demais), sendo necessário confirmar posteriormente a característica bioquímica almejada usando a enzima não fusionada ao bacteriófago.

Por fim, o controle da quantidade de ErA sendo apresentada nas estruturas virais facilitaria não somente o rastreamento da mesma no organismo, por meio de estudos de biodistribuição por titulação/sequenciamento de bacteriófagos, mas também serviria de base para o desenvolvimento de novas proteoformas de L-ASNase com maior estabilidade sérica

3.4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, demonstrou-se ser possível conjugar biologicamente a enzima ErA a bacteriófagos filamentosos das linhagens M13 e fd, utilizando-se como estratégia o sistema *SpyCatcher/SpyTag*. O conjugado apresentou atividade enzimática e foi purificado de maneira eficiente, inclusive diretamente de lisados celulares não submetidos previamente à cromatografia de afinidade.

Fusão da proteína *SpyCatcher* na posição N-terminal da ErA não impactou negativamente na sua atividade enzimática e níveis de expressão consideráveis da enzima na fração solúvel de lisados celulares de *E. coli* BL21(DE3) foram atingidos. Além disso, bacteriófagos geneticamente modificados contendo o peptídeo *SpyTag* fusionado tanto à porção N-terminal da proteína pIII da linhagem M13, quanto à porção N-terminal da proteína pVIII da linhagem fd foram obtidos com sucesso. Número de cópias do peptídeo *SpyTag* presente na estrutura das linhagens de bacteriófagos utililizadas, o qual variou entre 5 (para a linhagem M13) e por volta de 50 (para a linhagem fd), foi diretamente proporcional ao número de moléculas de *SpyCatcher*_ErA a eles conjugado, ou seja, quanto maior a quantidade de *SpyTag* presente no bacteriófago, maior a densidade de moléculas *SpyCatcher*_ErA fusionadas ao mesmo.

Por fim, testes *in vivo* de estabilidade dos conjugados na circulação sanguinea de camundongos C57BL/6J demonstraram ser possível sequenciar e titular os bacteriófagos presentes em seu plasma. Não houve diferença de depuração entre os bacteriófagos contendo ErA fusionada na proteína pIII em relação a clones controle, mas um aumento significativo de eliminação plasmática foi evidenciado em bacteriófagos contendo por volta de 50 cópias de ErA fusionadas à proteína pVIII. Resultados corroboram com estudos da literatura que evidenciam um aumento da taxa de eliminação de partículas virais, decorrentes de sua ligação a receptores celulares presentes em células fagocíticas, em funçao do número de biomoléculas a eles conjugados.

4 DISCUSSÃO GERAL

Neste projeto, importantes avanços biotecnológicos relativos à produção e aplicação da ErA foram obtidos. Demonstrou-se ser possível não somente expressar a ErA com cauda de histina a partir de um sistema otimizado de SPLC mas também de conjugá-la eficientemente a diferentes linhagens de bacteriófagos filamentosos. Além disso, os resultados apresentados com o projeto de bioconjugação demonstram uma nova possibilidade de melhoria em relação à purificação da enzima e de estabelecimento de plataformas de desenvolvimento de versões melhoradas da L-ASNase, tendo como base sua produção em sistemas de SPLC.

Ao desenvolvermos uma linhagem de bacteriófago contendo em torno de 50 cópias de *SpyTag* em sua estrutura, foi possível purificar a ErA fusionada à proteína *SpyCatcher* diretamente do lisado celular. Não houve necessidade de purificação prévia da proteína de fusão para reação com o bacteriófago e obtenção do conjugado de interesse.. Em comparação à cromatografia de afinidade, o método não requereu nenhuma etapa prévia de otimização (volume padrão de 1/6 de solução de PEG/NaCl foi suficiente) e levou pouco tempo para que a purificação fosse finalizada (uma hora necessária de incubação com PEG/NaCl, mais 20 minutos de centrifugação). Ainda com relação aos métodos de purificação por cromatografia, a utilização de PEG/NaCl dispensou o uso de resinas de cromatografia. Esta técnica seria extremamente útil na purificação de proteínas produzidas em sistemas de SPLC, por exemplo, reduzindo ainda mais o tempo necessário para obtenção da proteína final na sua forma pura.

A possibilidade de síntese da ErA em tecnologia de SPLC, associada à conjugação da ErA a bacteriófagos, viabilizaria, não somente uma rápida purificação da proteína, mas também robustos estudos de evolução dirigida. Neste trabalho, demonstramos ser possível associar a proteína L-ASNase a uma sequência genética específica (i.e. à sequência nucleotídia presente no genoma do bacteríofago responsável pela expressão do peptídeo *SpyTag*). Uma vez que essa relação é estabelecida, basta-se sequenciar o conjugado proteico-viral para que se possa então associar uma determinada característica bioquímica observada com o conjugado a uma sequência genética específica e, consequentemente, a uma variante da L-ASNase. Essa relação é especialmente importante no caso da expressão de proteínas em sistemas de SPLC, pois permite aumentar consideravelmente o número de proteínas mutantes

que podem ser produzidas ao mesmo tempo. Associado a isto, existe ainda a possibilidade de avaliação de parâmetros farmacocinéticos destas proteoformas a partir da injeção em conjunto destas biomoléculas na corrente sanguinea e sua posterior caracterização por sequenciamento ou titulação.

Por todos esses aspectos, concluímos haver grandes possibilidades de inovações biotecnológicas a partir do uso da ErA em sistemas de tecnologia de SPLC e de bioconjugação a bacteriófagos aqui desenvolvidos e caracterizados. Tanto a síntese *in vitro* da ErA com atividade biológica e cauda de histidina em síntese de SPLC, quanto a bioconjugação da enzima em duas linhagens de bacteriófagos diferentes e sua posterior aplicação *in vivo* foram obtidas com êxito neste projeto de pesquisa.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, novos estudos de purificação e caracterização da ErA, além do aprimoramento das técnicas de SPLC e bioconjugaçao serão necessários. Uma vez que conseguimos purificar a ErA por cromatografia de afinidade e expressa no nosso sistema de SPLC a partir do vetor de expressão pIVEX, no entanto sem atividade enzimática (ver item 2.3.3 – "Construção do Plasmídeo e Expressão da ErA"), pretendemos repetir o mesmo protocolo de purificação para a nova versão da enzima biologicamente ativa obtida, a qual foi produzida a partir do vetor de expressão pET15b. Para isso, bastará repetir o processo de síntese proteica utilizando um volume de reação maior, e submeter o produto obtido à purificação utilizando uma resina de cromatografia de afinidade. Uma vez purificada a enzima, prosseguiremos com sua caracterização, onde serão avaliadas diversos parâmetros bioquímicos, tais como atividade específica, em unidades por miligrama (U/mg), constantes de afinidade pelo substrato (K_m) e estabilidade térmica. Expressão de novas mutantes da ErA poderiam entao ser obtidas por meio da utilização da plataforma de SPLC.

Além disso, pretendemos seguir com o processo de otimização do extrato celular e da solução energética utilizada nos protocolos de SPLC. Quanto ao extrato, sugere-se repetir o procedimento de lise celular utilizando sonicação e prensa francesa, mas utilizando exatamente as mesmas condições de cultivo (composição do meio de cultivo, tempo de cultivo, temperatura e agitação). Além disso, avaliaremos a concentração proteica e a eficiência de cada extrato celular utilizando triplicatas biológicas ao invés de triplicatas experimentais, isto é, meios de cultivo serão cultivados e lisados separadamente. Desta forma, será possível avaliar o melhor método para lise celular considerando todas as variáveis biológicas presentes. Quanto à solução energética, pretende-se estudar o efeito da suplementação dos aminoácidos L-asparagina, L-aspartato e L-glutamina na síntese de ErA.

Ademais, pretendemos utilizar o método de bioconjugação aqui desenvolvido de forma que este possa ser utilizado eficientemente para a purificação da ErA. Para isto, é imprescindível que adaptações nesta técnica sejam implementadas de modo que possamos obter, ao final, não apenas o conjugado em si, mas também a ErA isoladamente, ou seja, livre do bacteriófago. Uma das possibilidades seria a separação da proteína do bacteriófago por

meio da utilização de sítios de clivagem proteolítica entre a proteína e o bacteriófago. Além disso, a utilização de tecnologias *SpyCatcher/SpyTag* com constantes de afinidade aprimoradas (KEEBLE et al., 2019), favorecia inclusive o aumento do rendimento de purificação utilizando esta metodologia, embora os valores atingidos neste trabalho já sejam bastante promissores (44% de rendimento).

Por fim, sugere-se a inversão do papel das partes biológicas *SpyCatcher/SpyTag* no sistema de bioconjugação aqui desenvolvido. Pretendemos desenvolver linhagens de bacteriófagos que sejam capazes de expressar o domínio proteico *SpyCatcher* em suas proteínas de capsídeo (e não o peptídeo *SpyTag*). Desta forma, seria possível então expressar proteínas a serem conjugadas nesses bacteriófagos contendo apenas o peptídeo *SpyTag* em sua estrutura, não sendo mais necessários criar proteínas fusionadas à *SpyCatcher*, aumentando com isso as chances de obtenção de proteínas biologicamente ativas e permitindo o avanço da técnicas a outras proteínas além da própria ErA.

6 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

O mestrado iniciou-se oficialmente no dia 09 de agosto de 2018. No decorrer do curso, foram cursadas e finalizadas as seguintes disciplinas: BTC5838 – Estratégias para a Engenharia de Proteínas Terapêuticas Recombinantes, FBT 5773 – Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, BTC5743 – Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia – Universidade de São Paulo), FBA5728 – Aprimoramento Pedagógico, FBT5713 – Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica Industrial, ICB5754 – Da Clonagem à Análise de Proteínas – Métodos e Estratégias (Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo) e ICB 5751 – As Origens da Biologia Molecular (Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo). Todas as disciplinas foram finalizadas com conceito A e 100% de frequência (ANEXO A).

Os resultados referentes à expressão da ErA em sistema de SPLC foram realizados em colaboração com a Profª Dra. Solange Serrano situado no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantã. Os resultados referentes à conjugação da ErA a bacteriófagos foram realizados no laboratório do Profº Dr. Ratmir Derda, situado na Universidade de Alberta, no Canadá. Tive a oportunidade de realizar estágio em seu laboratório graças ao financiamento oferecido pela FAPESP, através da Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE).

Em relação à produção bibliográfica, foram publicados 3 artigos (sendo um como primeiro autor). Quarto artigo está em fase de análise e um quinto em elaboração. Lista das produções está sumarizado na tabela abaixo (Tabela 5). O primeiro artigo "*L-Asparaginase from E. chrysanthemi expressed in glycoswitch®: effect of His-Tag fusion on the extracellular expression*" se refere aos trabalhos desenvolvidos pelo ex membro de nosso grupo de pesquisa Dr. Brian Effer, onde pude contribuir durante o desenvolvimento dos experimentos. O segundo artigo *"Glycosylation of L-asparaginase from E. coli through yeast expression and site-directed mutagenesis"* se refere aos resultados obtidos com o meu projeto de pesquisa iniciado durante o período de iniciação científica e finalizado durante o mestrado, também sob

orientação da minha atual supervisora Profa Dra Gisele Monteiro, com bolsa FAPESP. O terceiro artigo, "*Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer"* é uma revisão das técnicas usadas para avaliação da aplicabilidade clínica da L-ASNase (tais como purificação, ensaios de atividade enzimática e de citotoxicidade), escrito em conjunto com os demais membros do laboratório. No quarto artigo, "*Extracellular expression of Saccharomyces cerevisiae's L-asparaginase II in Pichia pastoris results in novel enzyme with better parameters"*, participei como revisor e editor do manuscrito. Por fim, o quinto e último manuscrito "*Multivalent Display of L-Asparaginase on Bacteriophages as a Tool to In Vivo Investigation*" se refere aos trabalhos de conjugação da ErA a bacteriófagos desenvolvidos no exterior e relativos ao presente projeto de pesquisa de mestrado.

Além dessas produções, os resultados referentes à síntese da ErA em SPLC e o processo de otimização do sistema serão compilados e submetidos à revista *Process Biochemistry.*

Tabela 5. Lista de manuscritos aceitos ou em processo de aceite/elaboração desenvolvidos durante o período do mestrado.

ARTIGO	**REVISTA**	**DOI**
L-Asparaginase from E. chrysanthemi expressed in glycoswitch®: effect of His-Tag fusion on the extracellular expression	*Preparative Biochemistry and Biotechnology*	10.1080/10826068.2019.1599396 (ANEXO B)
Glycosylation of L-asparaginase from E. coli through yeast expression and site-directed mutagenesis	*Biochemical Engineering Journal*	10.1016/j.bej.2020.107516 (ANEXO C)
Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer	*Blood Reviews*	10.1016/j.blre.2020.100651 (ANEXO D)
Extracellular expression of Saccharomyces cerevisiae's L-asparaginase II in Pichia pastoris results in novel enzyme with better parameters	*Scientific Reports*	Sob análise (ANEXO E)
Multivalent Display of L-Asparaginase on Bacteriophages as a Tool to In Vivo Investigation	*ACS Chemical Biology*	Em elaboração (ANEXO F)

Além disso, participei da XXIII Semana Farmacêutica da FCF-USP, onde pude apresentar um pôster com os meus resultados referentes aos trabalhos desenvolvidos na

graduação (ANEXO G). Participei também do “2º Seminario Internacional de Bioprocessos” organizado pela Eppendorf e Kerry no dia 15 de agosto de 2018 e do “Simpósio sobre o Uso de Estatística em Ciência e Transferência de Tecnologia” realizado no IQ-USP nos dias 13 e 14 de setembro de 2018. Por fim, participei ativamente no planejamento e desenvolvimento experimental do projeto “QS-Comms”, projeto científico relacionado à caracterização de sistemas de *quorum sensing* bacterianos. Esse projeto foi desenvolvido para a competição internacional de biologia sintética “iGEM”, e ao final, nossa equipe foi agraciada com a medalha de prata e o prêmio de melhor projeto na categoria *“Best Measurement*”, em Boston, nos EUA (ANEXO H).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIGA, R. et al. Point-of-care production of therapeutic proteins of good-manufacturing-practice quality. **Nature Biomedical Engineering**, v. 2, n. 9, p. 675–686, 9 set. 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41551-018-0259-1>. Acesso em: 25 fev. 2019.

AGHAIYPOUR, K.; WLODAWER, A.; LUBKOWSKI, J. Do bacterial L-asparaginases utilize a catalytic triad Thr-Tyr-Glu? **Biochimica et biophysica acta**, v. 1550, n. 2, p. 117–28, 17 dez. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11755201>. Acesso em: 17 mar. 2019.

ANGENENDT, P. et al. Cell-Free Protein Expression and Functional Assay in Nanowell Chip Format. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 7, p. 1844–1849, 1 abr. 2004.

ANVISA. **Leucemia linfoblástica aguda ganha novo tratamento - RSS - Anvisa**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/leucemia-linfoblastica-aguda-ganha-novo-tratamento/219201?inheritRedirect=false>. Acesso em: 17 fev. 2019.

APPONYI, M. A. et al. Cell-Free Protein Synthesis for Analysis by NMR Spectroscopy. In: [s.l.] Humana Press, 2008. p. 257–268.

ASSELIN, B. L. The three asparaginases: Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 457, p. 621–629, 1999.

AZZAZY, H. M. E.; HIGHSMITH, W. E. **Phage display technology: Clinical applications and recent innovationsClinical Biochemistry**Elsevier, , 1 set. 2002. .

BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D. G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. 2009. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S016777990900105X/1-s2.0-S016777990900105X-main.pdf?_tid=938412ba-f052-4685-995e-cb971611144d&acdnat=1528910131_94367837d9d69814ec8d86f6ca35b4a3>. Acesso em: 13 jun. 2018.

BANERJEE, D. et al. Multivalent display and receptor-mediated endocytosis of transferrin on virus-like particles. **ChemBioChem**, v. 11, n. 9, p. 1273–1279, 14 jun. 2010.

BRÖDEL, A. K.; WÜSTENHAGEN, D. A.; KUBICK, S. Cell-free protein synthesis systems

derived from cultured mammalian cells. In: **Structural Proteomics: High-Throughput Methods: Second Edition**. [s.l.] Springer New York, 2014. 1261p. 129–140.

BUNDY, B. C.; FRANCISZKOWICZ, M. J.; SWARTZ, J. R. Escherichia coli-based cell-free synthesis of virus-like particles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 28–37, 1 maio 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.21716>. Acesso em: 24 abr. 2020.

BUNDY, B. C.; SWARTZ, J. R. Site-specific incorporation of p-propargyloxyphenylalanine in a cell-free environment for direct protein-protein click conjugation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 255–263, 17 fev. 2010.

CAI, Q. et al. A simplified and robust protocol for immunoglobulin expression in *E scherichia coli* cell-free protein synthesis systems. **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 3, p. 823–831, maio 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.2082>. Acesso em: 25 jul. 2018.

CALHOUN, K. A.; SWARTZ, J. R. An Economical Method for Cell-Free Protein Synthesis using Glucose and Nucleoside Monophosphates. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 4, p. 1146–1153, 5 set. 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp050052y>. Acesso em: 13 abr. 2020.

CARLSON, E. D. et al. Cell-free protein synthesis: applications come of age. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 5, p. 1185–94, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22008973>. Acesso em: 27 jun. 2018.

CASCHERA, F.; NOIREAUX, V. Synthesis of 2.3 mg/ml of protein with an all Escherichia coli cell-free transcription–translation system. **Biochimie**, v. 99, p. 162–168, 1 abr. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908413004367>. Acesso em: 9 out. 2019.

CHMP. Oncaspar, INN-pegaspargase. 2015. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/003789/WC500200737.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2018.

COSTA-SILVA, T. A. et al. Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer. **Blood Reviews**, 2020.

DAMIATI, S. et al. Cell-Free Approaches in Synthetic Biology Utilizing Microfluidics. **Genes**, v. 9, n. 3, 6 mar. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29509709>. Acesso em: 19 mar. 2019.

DES SOYE, B. J. et al. Establishing a High-Yielding Cell-Free Protein Synthesis Platform Derived from *Vibrio natriegens*. **ACS Synthetic Biology**, v. 7, n. 9, p. 2245–2255, 21 set. 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssynbio.8b00252>. Acesso em: 28 set. 2019.

DEVRIES, J. K.; ZUBAY, G. DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the alpha-fragment of the enzyme beta-galactosidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 57, n. 4, p. 1010–1012, 1967.

DOPP, B. J. L.; TAMIEV, D. D.; REUEL, N. F. Cell-free supplement mixtures: Elucidating the history and biochemical utility of additives used to support in vitro protein synthesis in E. coli extract. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 246–258, 1 jan. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975018302040>. Acesso em: 28 set. 2019.

DOUER, D. et al. Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction in adults aged 55 years or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2744–2750, 1 abr. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17132721>. Acesso em: 17 mar. 2020.

ENDO, Y.; SAWASAKI, T. **High-throughput, genome-scale protein production method based on the wheat germ cell-free expression system**. [s.l: s.n.].

ENSHELL-SEIJFFERS, D.; SMELYANSKI, L.; GERSHONI, J. M. **The rational design of a “type 88” genetically stable peptide display vector in the filamentous bacteriophage fdNucleic Acids Research**. [s.l: s.n.].

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment report Spectrila**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ema.europa.eu/contact>. Acesso em: 6 nov. 2018.

FAHNERT, B.; LILIE, H.; NEUBAUER, P. Inclusion bodies: formation and utilisation. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 89, p. 93–142, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217157>. Acesso em: 13 jun. 2018.

FUJIWARA, K.; DOI, N. Biochemical Preparation of Cell Extract for Cell-Free Protein Synthesis without Physical Disruption. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0154614, 29 abr. 2016. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0154614>. Acesso em: 6 abr. 2020.

FUJIWARA, K.; NOMURA, S. M. Condensation of an Additive-Free Cell Extract to Mimic the Conditions of Live Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54155, 10 jan. 2013. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0054155>. Acesso em: 20 jun. 2020.

GARAMELLA, J. et al. The All *E. coli* TX-TL Toolbox 2.0: A Platform for Cell-Free Synthetic Biology. **ACS Synthetic Biology**, v. 5, n. 4, p. 344–355, 15 abr. 2016. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssynbio.5b00296>. Acesso em: 6 mar. 2019.

GERVAIS, D. et al. Validation of a 30-year-old process for the manufacture of l-asparaginase from Erwinia chrysanthemi. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 4, p. 453–460, 21 abr. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22907565>. Acesso em: 13 jun. 2018.

HEINIS, C. et al. Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 7, p. 502–507, 31 maio 2009.

HESS, G. T. et al. M13 bacteriophage display framework that allows sortase-mediated modification of surface-accessible phage proteins. **Bioconjugate Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1478–1487, 18 jul. 2012.

HOFFMANN, M. et al. Rapid translation system: A novel cell-free way from gene to protein. **Biotechnology Annual Review**, v. 10, n. SPEC. ISS., p. 1–30, 1 jan. 2004.

HUNT, J. P. et al. Engineering Cell-Free Protein Synthesis for High-Yield Production and Human Serum Activity Assessment of Asparaginase: Toward On-Demand Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Biotechnology Journal**, p. e1900294, 6 jan. 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31904183>. Acesso em: 1 abr. 2020.

INCA. **Tipos de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>. Acesso em: 18 jun. 2020.

JAROENTOMEECHAI, T. et al. Single-pot glycoprotein biosynthesis using a cell-free transcription-translation system enriched with glycosylation machinery. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2686, 12 dez. 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-05110-x>. Acesso em: 20 nov. 2018.

JEWETT, M. C. et al. An integrated cell-free metabolic platform for protein production and synthetic biology. **Molecular systems biology**, v. 4, p. 220, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854819>. Acesso em: 28 set. 2019.

JEWETT, M. C.; SWARTZ, J. R. Mimicking theEscherichia coli cytoplasmic environment activates long-lived and efficient cell-free protein synthesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 19–26, 5 abr. 2004. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.20026>. Acesso em: 10 jul. 2018.

KEEBLE, A. H. et al. Evolving Accelerated Amidation by SpyTag/SpyCatcher to Analyze Membrane Dynamics. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 56, n. 52, p. 16521–16525, 22 dez. 2017.

KEEBLE, A. H. et al. Approaching infinite affinity through engineering of peptide-protein interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 52, p. 26523–26533, 26 dez. 2019.

KHAIRIL ANUAR, I. N. A. et al. Spy&Go purification of SpyTag-proteins using pseudo-SpyCatcher to access an oligomerization toolbox. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2019.

KIGHTLINGER, W. et al. A cell-free biosynthesis platform for modular construction of protein glycosylation pathways. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2019.

KIM, D. M. et al. A highly efficient cell-free, protein synthesis system from Escherichia coli. **European Journal of Biochemistry**, v. 239, n. 3, p. 881–886, 1996.

KIM, D. M.; SWARTZ, J. R. Regeneration of adenosine triphosphate from glycolytic intermediates for cell-free protein synthesis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 74, n. 4, p. 309–16, 20 ago. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11410855>. Acesso em: 7 abr. 2020.

KIM, R. G.; CHOI, C. Y. Expression-independent consumption of substrates in cell-free expression system from Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 27–32, 17 nov. 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165600003266?via%3Dihub>. Acesso em: 20 mar. 2019.

KIM, T. W.; KIM, D. M.; CHOI, C. Y. Rapid production of milligram quantities of proteins

in a batch cell-free protein synthesis system. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 2, p. 373–380, 13 jul. 2006.

KORMAN, T. P.; OPGENORTH, P. H.; BOWIE, J. U. A synthetic biochemistry platform for cell free production of monoterpenes from glucose. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 24 maio 2017.

KUMAR, G.; CHERNAYA, G. Cell-free protein synthesis using multiply-primed rolling circle amplification products. **BioTechniques**, v. 47, n. 1, p. 637–639, 25 jul. 2009. Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000113171>. Acesso em: 24 abr. 2020.

KWON, Y.-C.; JEWETT, M. C. High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 8663, 2 ago. 2015. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep08663>. Acesso em: 27 jun. 2018.

LAROCCA, D. et al. Receptor-targeted gene delivery using multivalent phagemid particles. **Molecular Therapy**, v. 3, n. 4, p. 476–484, 2001.

LEHNINGER, A. L. et al. **Lehninger principles of biochemistry**. [s.l.] Macmillan, 2005.

LIU, D. V.; ZAWADA, J. F.; SWARTZ, J. R. Streamlining Escherichia Coli S30 extract preparation for economical cell-free protein synthesis. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 2, p. 460–465, mar. 2005.

LU, Y.; WELSH, J. P.; SWARTZ, J. R. Production and stabilization of the trimeric influenza hemagglutinin stem domain for potentially broadly protective influenza vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 1, p. 125–130, 2014.

MALIK, P. et al. Role of capsid structure and membrane protein processing in determining the size and copy number of peptides displayed on the major coat protein of filamentous bacteriophage. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, n. 1, p. 9–21, 5 jul. 1996.

MARINI, B. L. et al. Catalyzing improvements in ALL therapy with asparaginase. **Blood Reviews**, v. 31, n. 5, p. 328–338, set. 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X17300176>. Acesso em: 12 abr. 2019.

MARTIN, R. W. et al. Cell-free protein synthesis from genomically recoded bacteria enables

multisite incorporation of noncanonical amino acids. **Nature Communications 2018 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 23 mar. 2018.

MINTON, N. P. et al. Nucleotide sequence of the Erwinia chrysanthemi NCPPB 1066 l-asparaginase gene. **Gene**, v. 46, n. 1, p. 25–35, 1 jan. 1986. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378111986901630>. Acesso em: 6 mar. 2019.

MURTHY, T. V. . et al. Bacterial cell-free system for high-throughput protein expression and a comparative analysis of Escherichia coli cell-free and whole cell expression systems. **Protein Expression and Purification**, v. 36, n. 2, p. 217–225, 1 ago. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592804001159?via%3Dihub>. Acesso em: 25 fev. 2019.

NG, S. et al. Quantitative synthesis of genetically encoded glycopeptide libraries displayed on M13 phage. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 9, p. 1482–1487, 21 set. 2012.

NIRENBERG, M. **Historical review: Deciphering the genetic code - A personal accountTrends in Biochemical Sciences**Elsevier Ltd, , 1 jan. 2004. .

NIRENBERG, M. W.; MATTHAEI, J. H. The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 47, n. 10, p. 1588–602, 15 out. 1961. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14479932>. Acesso em: 18 fev. 2019.

OGONAH, O. W.; POLIZZI, K. M.; BRACEWELL, D. G. **Cell free protein synthesis: a viable option for stratified medicines manufacturing?Current Opinion in Chemical Engineering**Elsevier Ltd, , 1 nov. 2017. .

ORTLUND, E. et al. Reactions of Pseudomonas 7A glutaminase-asparaginase with diazo analogues of glutamine and asparagine result in unexpected covalent inhibitions and suggests an unusual catalytic triad Thr-Tyr-Glu. **Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1199–1204, 15 fev. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10684596>. Acesso em: 25 mar. 2020.

PARDEE, K. et al. Paper-based synthetic gene networks. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 940–54, 6 nov. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25417167>. Acesso em: 14 jun.

2018.

PARDEE, K. et al. Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1255–1266, 19 maio 2016a.

PARDEE, K. et al. Portable, On-Demand Biomolecular Manufacturing. **Cell**, v. 167, n. 1, p. 248- 259.e12, 22 set. 2016b.

PEREZ, J. G.; STARK, J. C.; JEWETT, M. C. Cell-Free Synthetic Biology: Engineering Beyond the Cell. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 12, p. a023853, dez. 2016. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a023853>. Acesso em: 14 jun. 2018.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 15 jan. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824725>. Acesso em: 28 fev. 2018.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 2012.

PRATT, J. Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems. In: HAMES, B. D.; HIGGINS, S. . (Ed.). **Transcription and Translation: A Practical Approach**. New York: Oxford ; Washington, D.C., 1984. p. 179–209.

QIAGEN. **Growth Of Bacterial Cultures - QIAGEN**. Disponível em: <https://www.qiagen.com/br/service-and-support/learning-hub/technologies-and-research-topics/plasmid-resource-center/growth-of-bacterial-cultures/>. Acesso em: 20 jun. 2020.

RAU, R. E. et al. Outcome of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma with hypersensitivity to pegaspargase treated with PEGylated Erwinia asparaginase, pegcrisantaspase: A report from the Children's Oncology Group. **Pediatric blood & cancer**, v. 65, n. 3, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29090524>. Acesso em: 2 out. 2019.

RICHARDSON, D. et al. Accelerated pharmaceutical protein development with integrated cell free expression, purification, and bioconjugation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2018.

RODI, D. J.; SOARES, A. S.; MAKOWSKI, L. Quantitative assessment of peptide sequence

diversity in M13 combinatorial peptide phage display libraries. **Journal of Molecular Biology**, v. 322, n. 5, p. 1039–1052, 2002.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. **Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challengesFrontiers in Microbiology**Frontiers Research Foundation, , 2014. . Disponível em: </pmc/articles/PMC4029002/?report=abstract>. Acesso em: 27 jun. 2020.

RUSTAD, M. et al. Cell-free TXTL synthesis of infectious bacteriophage T4 in a single test tube reaction. **Synthetic Biology**, v. 3, n. 1, 1 jan. 2018.

SALEHI, A. S. M. et al. Cell-free protein synthesis of a cytotoxic cancer therapeutic: Onconase production and a just-add-water cell-free system. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 2, p. 274–281, fev. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26380966>. Acesso em: 14 jun. 2018.

SCHINN, S. M. et al. **Protein synthesis directly from PCR: Progress and applications of cell-free protein synthesis with linear DNANew Biotechnology**Elsevier B.V., , 25 jun. 2016. .

SCHWARZ, D. et al. Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems. **Nature Protocols**, v. 2, n. 11, p. 2945–2957, 15 nov. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18007631>. Acesso em: 28 set. 2019.

SHIMIZU, Y. et al. Cell-free translation reconstituted with purified components. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 751–755, 1 ago. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479568>. Acesso em: 27 jun. 2018.

SHRESTHA, P.; HOLLAND, T. M.; BUNDY, B. C. Streamlined extract preparation for Escherichia coli-based cell-free protein synthesis by sonication or bead vortex mixing. **BioTechniques**, v. 53, n. 3, p. 163–74, set. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22963478>. Acesso em: 10 jul. 2018.

SHRESTHA, P.; SMITH, M. T.; BUNDY, B. C. Cell-free unnatural amino acid incorporation with alternative energy systems and linear expression templates. **New Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 28–34, 25 jan. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678413001283>. Acesso em: 19

fev. 2019.

SIDHU, S. S.; WEISS, G. A.; WELLS, J. A. High copy display of large proteins on phage for functional selections. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, n. 2, p. 487–495, 18 fev. 2000.

SITARAMAN, K. et al. A novel cell-free protein synthesis system. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 3, p. 257–263, 10 jun. 2004.

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage display. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 2, p. 391–410, 1997.

SOJITRA, M. et al. Genetically Encoded, Multivalent Liquid Glycan Array (LiGA). **bioRxiv**, p. 2020.03.24.997536, 25 mar. 2020.

SOLTANI, M. et al. Reengineering cell-free protein synthesis as a biosensor: Biosensing with transcription, translation, and protein-folding. **Biochemical Engineering Journal**, v. 138, p. 165–171, 15 out. 2018.

SOUSA, R.; MUKHERJEE, S. T7 RNA Polymerase. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 73, p. 1–41, 1 jan. 2003.

STAFFORD, R. L. et al. In vitro Fab display: a cell-free system for IgG discovery. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 27, n. 4, p. 97, 2014.

STAPLETON, J. A.; SWARTZ, J. R. A Cell-Free Microtiter Plate Screen for Improved [FeFe] Hydrogenases. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10554, 10 maio 2010. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0010554>. Acesso em: 25 fev. 2019.

STEIN, V. et al. A Covalent Chemical Genotype–Phenotype Linkage for in vitro Protein Evolution. **ChemBioChem**, v. 8, n. 18, p. 2191–2194, 17 dez. 2007. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.200700459>. Acesso em: 27 abr. 2020.

SULLIVAN, C. J. et al. A cell-free expression and purification process for rapid production of protein biologics. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 2, p. 238–248, 1 fev. 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201500214>. Acesso em: 6 abr. 2020.

SUN, Z. Z. et al. Protocols for implementing an Escherichia coli based TX-TL cell-free expression system for synthetic biology. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 79, p. e50762, 16 set. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24084388>. Acesso em: 19 fev. 2019.

TAKAHASHI, M. K. et al. Characterizing and prototyping genetic networks with cell-free

transcription-translation reactions. **Methods**, v. 86, p. 60–72, 15 set. 2015.

TAKAHASHI, M. K. et al. A low-cost paper-based synthetic biology platform for analyzing gut microbiota and host biomarkers. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2018.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, v. 7, n. 6, p. e577, 30 jun. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28665419>. Acesso em: 5 set. 2017.

TINAFAR, A.; JAENES, K.; PARDEE, K. **Synthetic Biology Goes Cell-FreeBMC Biology**BioMed Central Ltd., , 8 ago. 2019. .

TJHUNG, K. F. et al. Silent Encoding of Chemical Post-Translational Modifications in Phage-Displayed Libraries. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 1, p. 32–35, 13 jan. 2016.

TONG, W. H. et al. A prospective study on drug monitoring of PEGasparaginase and Erwinia asparaginase and asparaginase antibodies in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 123, n. 13, p. 2026–2033, 27 mar. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24449211>. Acesso em: 9 abr. 2020.

TRIANA, V.; DERDA, R. Tandem Wittig/Diels-Alder diversification of genetically encoded peptide libraries. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 15, n. 37, p. 7869–7877, 26 set. 2017.

UPADHYAY, A. K. et al. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of E. coli into active tetrameric protein. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 486, 15 set. 2014. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00486/abstract>. Acesso em: 13 jun. 2018.

VAN DER MEER, L. T. et al. In Vivo Imaging of Antileukemic Drug Asparaginase Reveals a Rapid Macrophage-Mediated Clearance from the Bone Marrow. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. 2, p. 214–220, fev. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27493268>. Acesso em: 7 fev. 2019.

WALKER, K. W.; GILBERT, H. F. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Effect of Redox Environment on the in Vitro and in Vivo Folding of RTEM-1 P-**

Lactamase and Escherichia coli Alkaline Phosphatase*. [s.l: s.n.].

WEISS, B. et al. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4. **Journal of Biological Chemistry**, 1968.

WEN, K. Y. et al. A Cell-Free Biosensor for Detecting Quorum Sensing Molecules in P. aeruginosa-Infected Respiratory Samples. **ACS Synthetic Biology**, v. 6, n. 12, p. 2293–2301, 15 dez. 2017.

WHITTAKER, J. W. **Cell-free protein synthesis: The state of the artBiotechnology Letters**, fev. 2013. . Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086573>. Acesso em: 24 abr. 2020.

WIEGAND, D. J. et al. Establishing a Cell-Free Vibrio natriegens Expression System. **Cite This: ACS Synth. Biol**, 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. Acesso em: 13 abr. 2020.

WILDING, K. M. et al. Endotoxin-Free E. coli-Based Cell-Free Protein Synthesis: Pre-Expression Endotoxin Removal Approaches for on-Demand Cancer Therapeutic Production. **Biotechnology journal**, v. 14, n. 3, p. e1800271, mar. 2019a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30024107>. Acesso em: 2 out. 2019.

WILDING, K. M. et al. Thermostable lyoprotectant-enhanced cell-free protein synthesis for on-demand endotoxin-free therapeutic production. **New Biotechnology**, v. 53, p. 73–80, nov. 2019b.

WLODARCZYK, S. R. et al. Effect of osmolytes on the activity of anti-cancer enzyme L-Asparaginase II from Erwinia chrysanthemi. **Process Biochemistry**, v. 81, p. 123–131, 1 jun. 2019.

YIN, G. et al. Aglycosylated antibodies and antibody fragments produced in a scalable in vitro transcription-translation system. **mAbs**, v. 4, n. 2, p. 217–225, 30 mar. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22377750>. Acesso em: 14 jun. 2018.

ZAKERI, B. et al. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 12, p. E690–E697, 20 mar. 2012.

ZAWADA, J. F. et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production-

a new approach for shortening protein production development timelines. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 7, p. 1570–1578, jul. 2011. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.23103>. Acesso em: 14 jun. 2018.

ZUBAY, G.; LEDERMAN, M.; DEVRIES, J. K. DNA-directed peptide synthesis. 3. Repression of beta-galactosidase synthesis and inhibition of repressor by inducer in a cell-free system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 58, n. 4, p. 1669–1675, 1967.

APÊNDICES

APÊNDICE A - LISTA DE SEQUÊNCIAS

INICIADORES

NOME	**SEQUÊNCIA**
ErA_pIVEX FW	CAAGAGAGCGGCCGCGCCGACAAGCTGCCG
ErA_pIVEX RV	CGCTCGAGGTAGGTGTGGAAGTATTCTTGG
ErA_pSB1A2 FW	GTTTCTTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGATGGCCGACAAGCTGCCG
ErA_pSB1A2 RV	GTTTCTTCCTGCAGCGGCCGCTACTAGTATTATTAGTAGGTGTGGAAGTATT CTTGG
*SpyCatcher*_FW	GTTTCTTCCATATGGCCATGGTTGATACCTTATCAGG
*SpyCatcher*_RV	GTTTCTTCCATATGACTGCCACCGCCACCGCTACCGCCACCGCCAATATGAG CGTCACCTTTAGTTGC
*SpyTag*_pIII	CATGCCCGGGTACCTTTCTATTCTCACGGTCTCTACTCTGC
*SpyTag*_pVIII	GTTTCTTGGCCCCAGAGG
NF10	TTTTGGAGATTTTCAACGTG
'96'	CCCTCATAGTTAGCGTAACG
Illumina_FW	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGCT CTTCCGATCTNNNNTTGGAGATTTTCAACGTG
Illumina_RV	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTC CGATCTNNNNACAGTTTCGGCCGA

OLIGOS DEGENERADOS

NOME	**SEQUÊNCIA**
Oligo do Vetor *SpyTag*_pIII	GCGCCCGGCCGAGGTCTCGCCACCACTTTCACCACTACCYTTNGTNGGYTTR TANGCRTCNACCATNACDATRTGNGCAGAGTAGAGACCGTGAG
Oligo do Vetor *SpyTag*_pVIII	GTTTCTTGGCCAACGTGGCCGGGCNCAYATHGTNATGGTNGAYGCNTAYAA RCCNACNAARTTGGCCTCTGGGGCCAAGAAAC

GENES

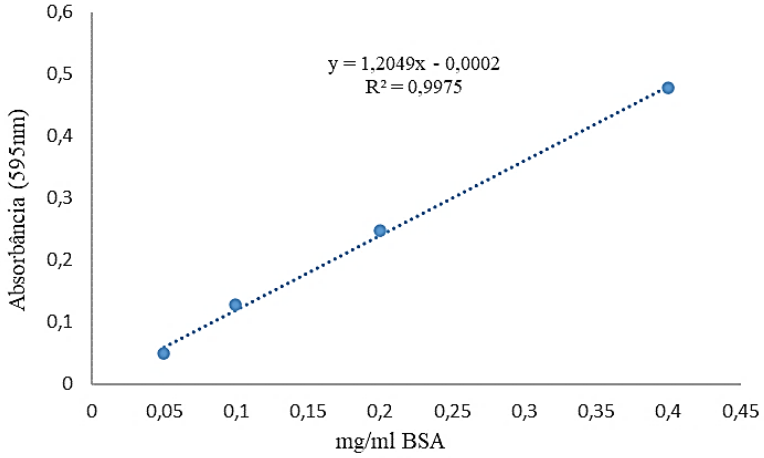
NOME	**SEQUÊNCIA**
ErA (otimizado)	ATGGAACGCTGGTTTAAGTCCCTGTTCGTCCTGGTCCTGTTTTTCGTCTTCAC CGCTAGTGCTGCCGACAAGCTGCCGAATATCGTCATCCTGGCAACCGGCGGT ACGATTGCGGGTTCAGCCGCAACCGGTACCCAGACCACCGGTTATAAAGCA GGTGCTCTGGGCGTTGACACCCTGATCAACGCGGTGCCGGAAGTTAAAAAG CTGGCCAATGTGAAAGGCGAACAGTTTTCAAACATGGCCTCGGAAAATATG ACCGGTGATGTGGTTCTGAAGCTGTCCCAACGTGTGAACGAACTGCTGGCCC GCGATGACGTTGATGGCGTCGTGATTACCCATGGTACCGACACGGTTGAAG AAAGTGCATACTTTCTGCACCTGACGGTCAAATCCGATAAGCCGGTTGTCTT CGTGGCAGCGATGCGTCCGGCCACCGCAATCAGCGCCGATGGTCCGATGAA CCTGCTGGAAGCCGTCCGTGTGGCAGGTGACAAACAGTCTCGTGGCCGCGG TGTGATGGTGGTTCTGAATGATCGTATTGGCTCAGCACGCTATATCACCAAA ACGAACGCTTCGACCCTGGATACGTTTAAGGCGAATGAAGAAGGTTACCTG

	GGCGTTATCATCGGTAACCGTATCTACTACCAAAACCGCATCGATAAGCTGC ATACCACCCGTAGCGTCTTTGATGTGCGCGGCCTGACCTCTCTGCCGAAGGT GGACATTCTGTATGGTTACCAGGATGACCCGGAATATCTGTACGATGCGGCC ATTCAACACGGTGTTAAAGGCATCGTCTATGCAGGCATGGGTGCTGGCAGC GTTTCTGTCCGTGGTATCGCGGGCATGCGCAAAGCCATGGAAAAGGGCGTC GTGGTTATTCGTAGCACCCGTACCGGTAATGGTATTGTTCCGCCGGATGAAG AACTGCCGGGTCTGGTCAGCGACTCCCTGAATCCGGCACATGCTCGTATTCT GCTGATGCTGGCACTGACCCGCACGTCCGACCCGAAAGTTATCCAAGAATA CTTCCACACCTAC
*SpyCatcher*_ErA	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGC GGCAGCCATATGGCCATGGTTGATACCTTATCAGGTTTATCAAGTGAGCAAG GTCAGTCCGGTGATATGACAATTGAAGAAGATAGTGCTACCCATATTAAATT CTCAAAACGTGATGAGGACGGCAAAGAGTTAGCTGGTGCAACTATGGAGTT GCGTGATTCATCTGGTAAAACTATTAGTACATGGATTTCAGATGGACAAGTG AAAGATTTCTACCTGTATCCAGGAAAATATACATTTGTCGAAACCGCAGCAC CAGACGGTTATGAGGTAGCAACTGCTATTACCTTTACAGTTAATGAGCAAGG TCAGGTTACTGTAAATGGCAAAGCAACTAAAGGTGACGCTCATATTGGCGG TGGCGGTAGCGGTGGCGGTGGCAGTCATATGGCCGACAAGCTGCCGAATAT CGTCATCCTGGCAACCGGCGGTACGATTGCGGGTTCAGCCGCAACCGGTACC CAGACCACCGGTTATAAAGCAGGTGCTCTGGGCGTTGACACCCTGATCAAC GCGGTGCCGGAAGTTAAAAAGCTGGCCAATGTGAAAGGCGAACAGTTTTCA AACATGGCCTCGGAAAATATGACCGGTGATGTGGTTCTGAAGCTGTCCCAAC GTGTGAACGAACTGCTGGCCCGCGATGACGTTGATGGCGTCGTGATTACCCA TGGTACCGACACGGTTGAAGAAAGTGCATACTTTCTGCACCTGACGGTCAAA TCCGATAAGCCGGTTGTCTTCGTGGCAGCGATGCGTCCGGCCACCGCAATCA GCGCCGATGGTCCGATGAACCTGCTGGAAGCCGTCCGTGTGGCAGGTGACA AACAGTCTCGTGGCCGCGGTGTGATGGTGGTTCTGAATGATCGTATTGGCTC AGCACGCTATATCACCAAAACGAACGCTTCGACCCTGGATACGTTTAAGGC GAATGAAGAAGGTTACCTGGGCGTTATCATCGGTAACCGTATCTACTACCAA AACCGCATCGATAAGCTGCATACCACCCGTAGCGTCTTTGATGTGCGCGGCC TGACCTCTCTGCCGAAGGTGGACATTCTGTATGGTTACCAGGATGACCCGGA ATATCTGTACGATGCGGCCATTCAACACGGTGTTAAAGGCATCGTCTATGCA GGCATGGGTGCTGGCAGCGTTTCTGTCCGTGGTATCGCGGGCATGCGCAAAG CCATGGAAAAGGGCGTCGTGGTTATTCGTAGCACCCGTACCGGTAATGGTAT TGTTCCGCCGGATGAAGAACTGCCGGGTCTGGTCAGCGACTCCCTGAATCCG GCACATGCTCGTATTCTGCTGATGCTGGCACTGACCCGCACGTCCGACCCGA AAGTTATCCAAGAATACTTCCACACCTACTGA
PROTEÍNAS	
NOME	**SEQUÊNCIA**
ErA (Sem Sequência Sinal)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAG ALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARD DVDGVVITHGTDTVEESAYFLHLTVKSDKPVVFVAAMRPATAISADGPMNLLE AVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIG NRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKG IVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVVIRSTRTGNGIVPPDEELPGLVSDSL NPAHARILLMLALTRTSDPKVIQEYFHTY
SpyCatcher	AMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGK TISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKA TKGDAHI
*SpyCatcher*_ErA	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFS KRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDG YEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDAHIGGGGSGGGGSHMADKLPNIVILA TGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASEN

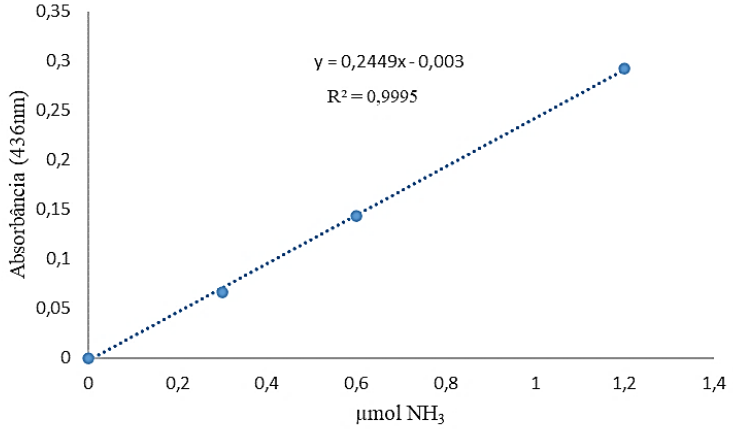
	MTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDTVEESAYFLHLTVKSDKPVVF VAAMRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKT NASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILY GYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVVIRS TRTGNGIVPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKVIQEYFHTY
*SpyTag*_pIII	AHIVMVDAYKPTKGSGESGGSAETVESCLAKSHTENSFTNVWKDDKTLDRYA NYEGCLWNATGVVVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEG GGTKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNN RFRNRQGALTVYTGTVTQGTDPVKTYYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAF HSGFNEDLFVCEYQGQSSDLPQPPVNAGGGSGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGG SEGGGSGGGSGSGDFDYEKMANANKGAMTENADENALQSDAKGKLDSVATD YGAAIDGFIGDVSGLANGNGATGDFAGSNSQMAQVGDGDNSPLMNNFRQYLP SLPQSVECRPFVFGAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVFSTFANILR NKES
*SpyTag*_pVIII	AEGGQRGRAHIVMVDAYKPTKLASGADPAKAAFDSLQASATEYIGYAWAMVV VIVGATIGIKLFKKFTSKAS

APÊNDICE B - CURVAS DE CALIBRAÇÃO

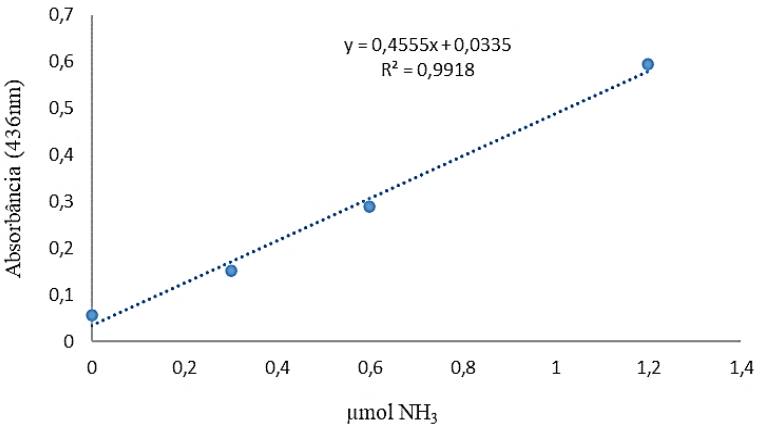
Curva de Calibração de *Bradford* (Relativa ao item 2.2.8)



Curva de Calibração de *Nessle*r (Relativa ao item 2.2.10)



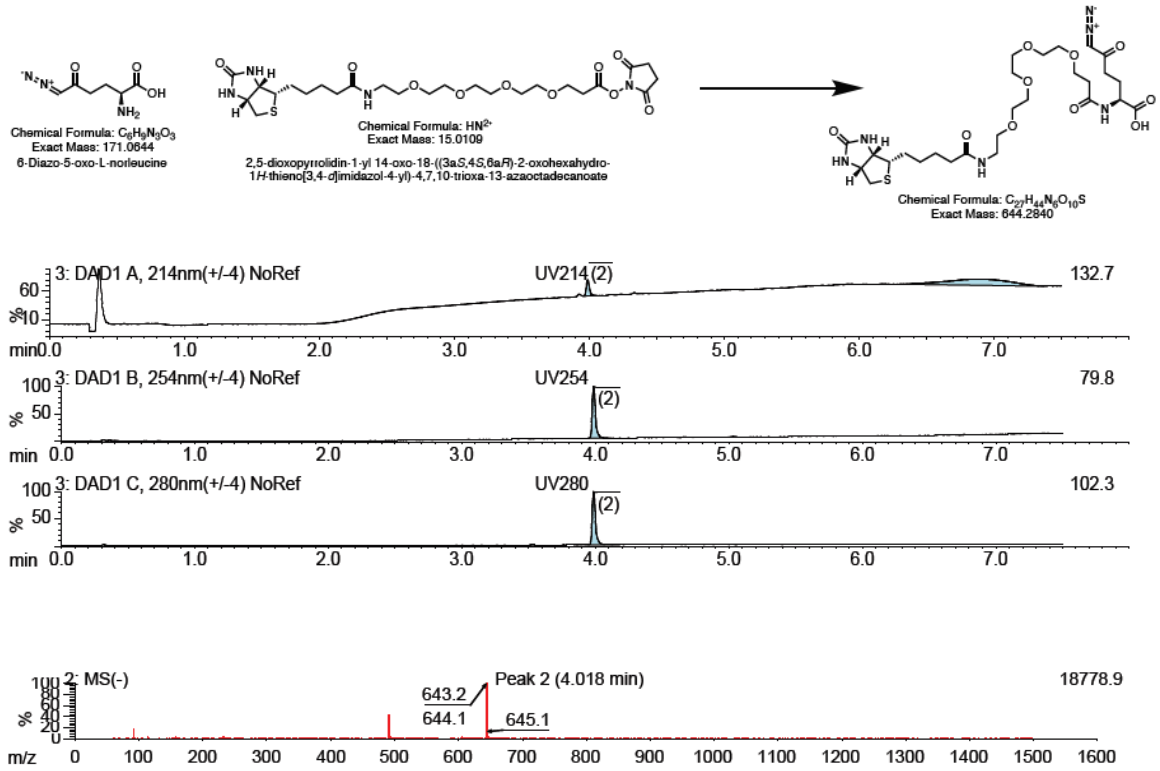
Curva de Calibração de *Nessle*r (Relativa ao 3.2.15)



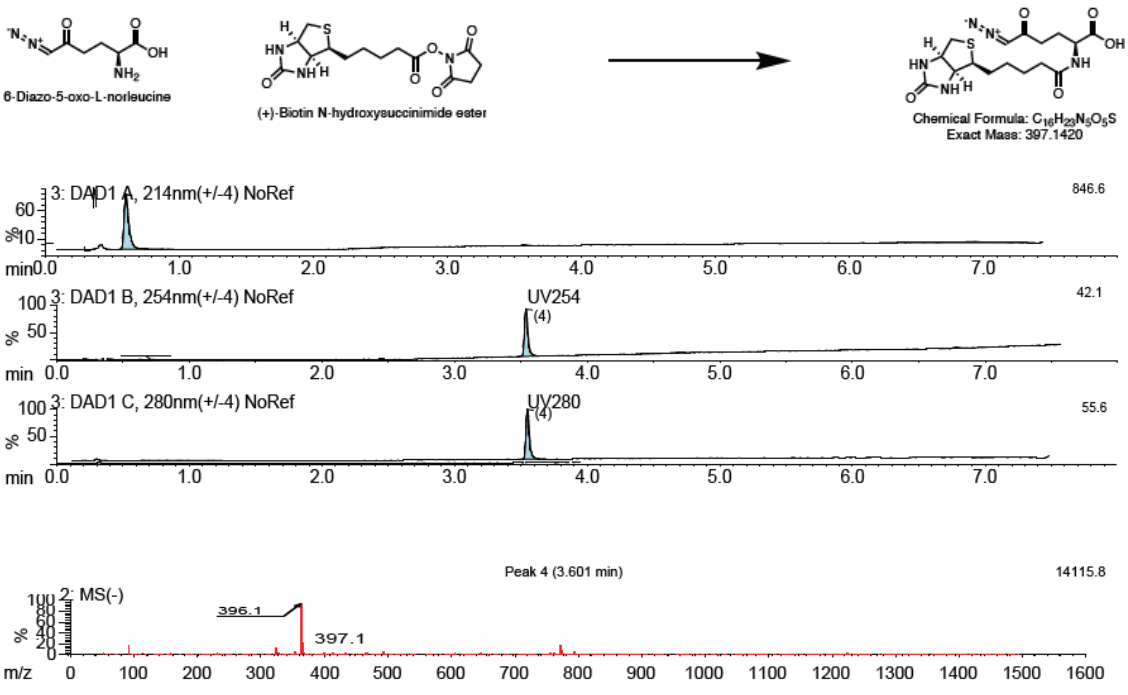
APÊNDICE C - SÍNTESE MOLÉCULAS DERIVADAS DE DON

Síntese de moléculas derivadas de DON com rota sintética (acima) e dados de LC-MS comprovando formação dos respectivos produtos.

Síntese DON-PEG$_4$-Biotina

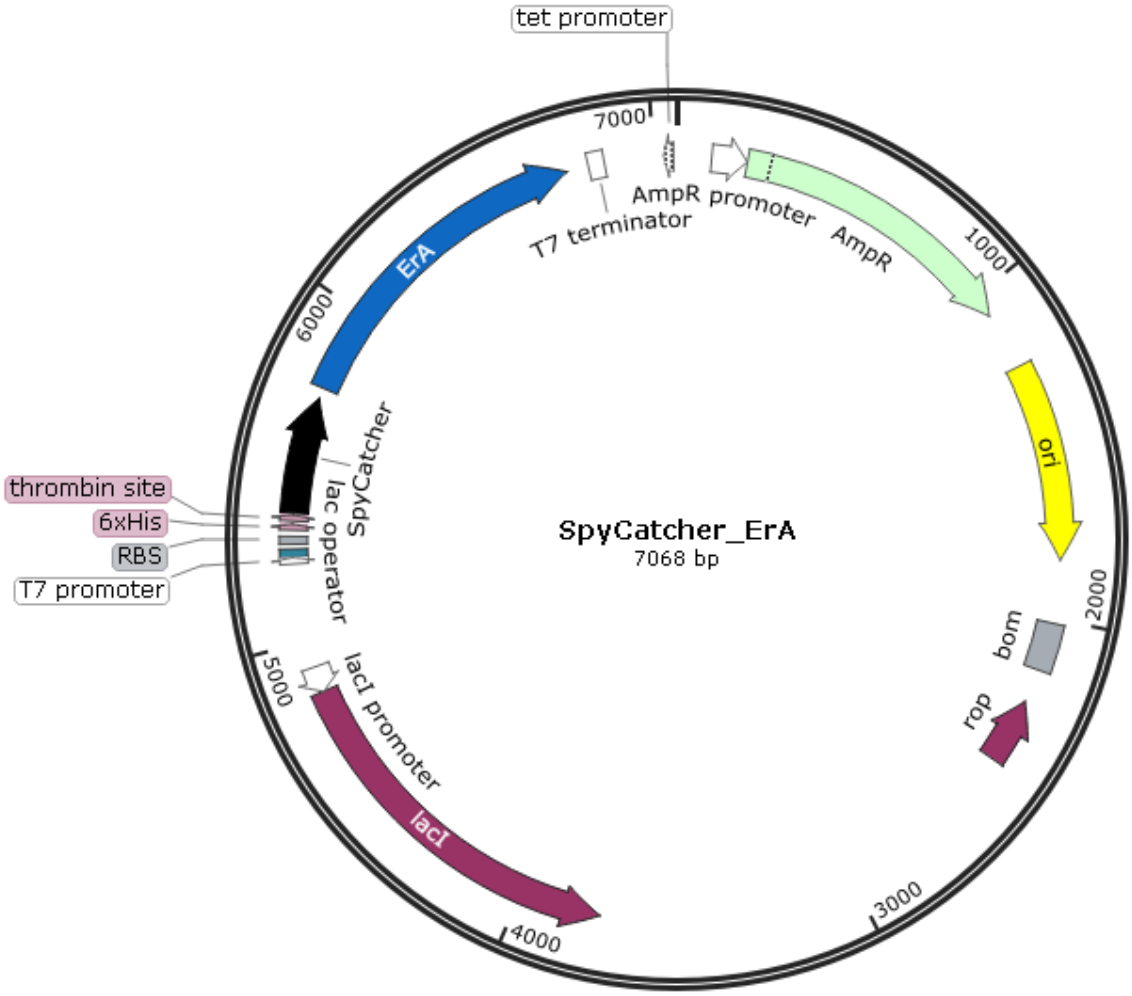


Síntese DON-Biotina

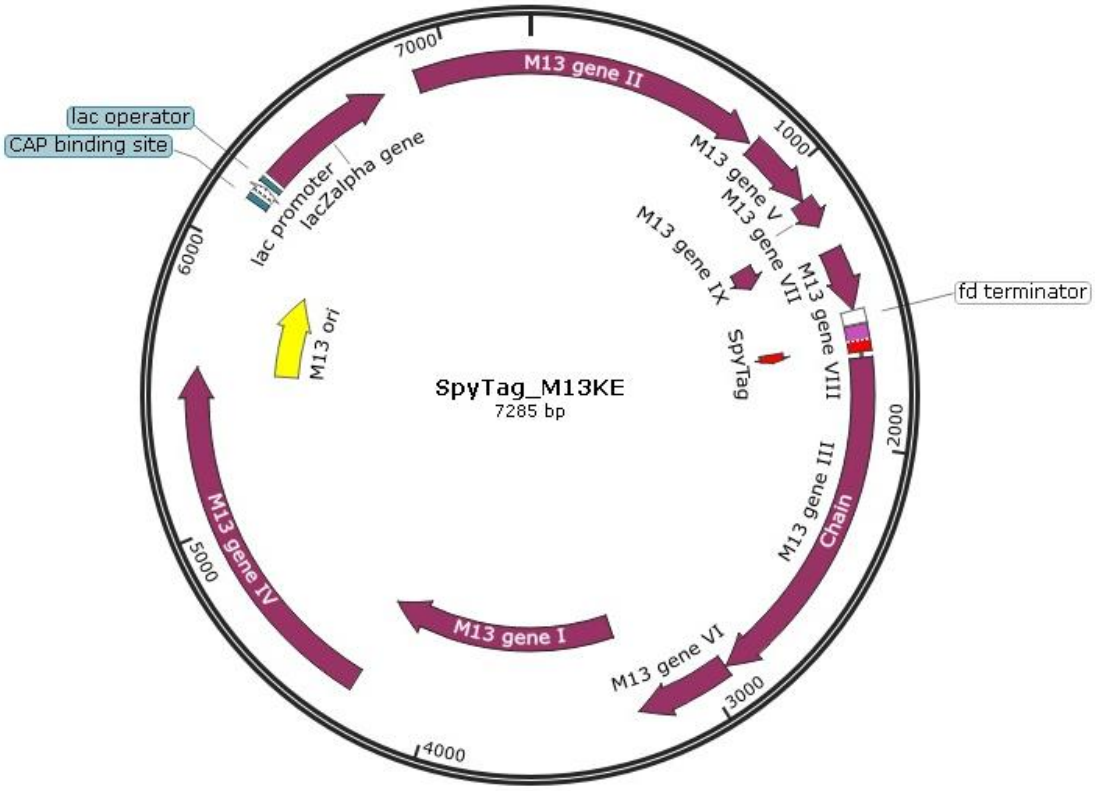


APÊNDICE D – MAPAS DOS VETORES

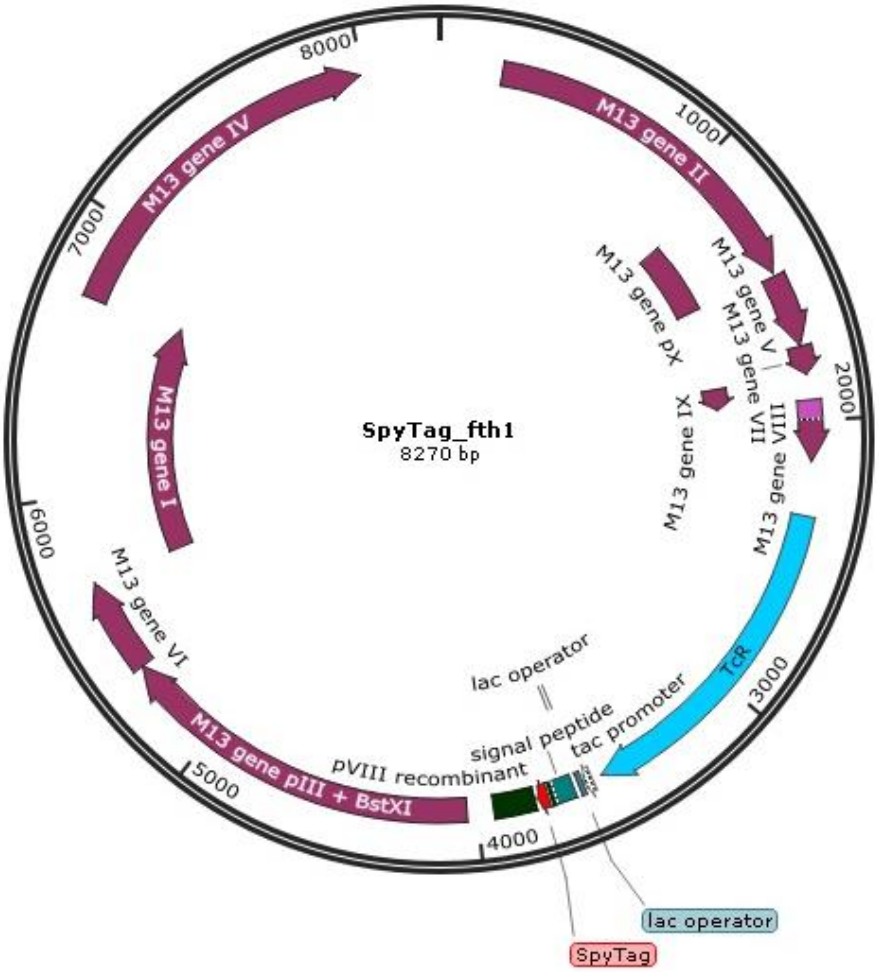
Vetor *SpyCatcher*_ErA. Gene *SpyCatcher* foi inserido à porção N-terminal do gene da ErA sem sua sequência sinalizadora, previamente clonado no vetor pET15b.



Vetor *SpyTag*_M13KE. Sequência *SpyTag* foi clonada na posição N-terminal do gene da cadeia proteica da proteína pIII, logo após sua sequência sinal.

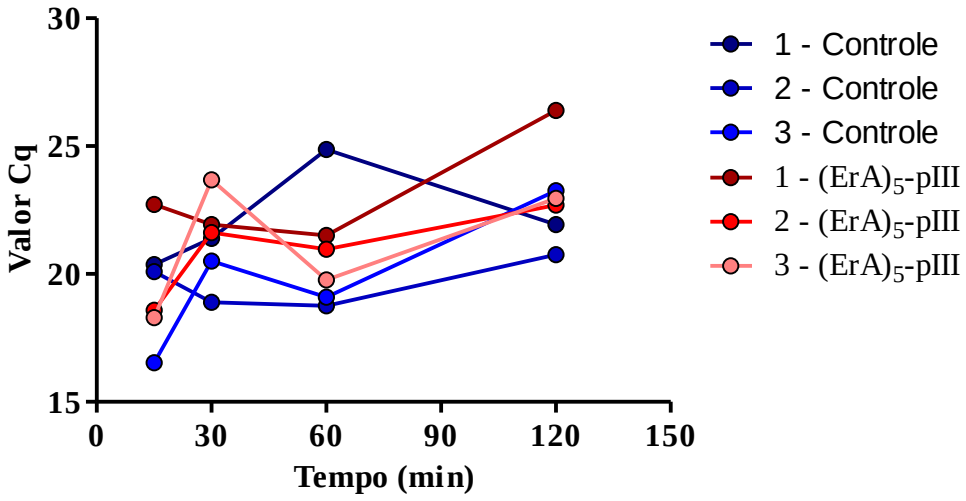


Vetor *SpyTag*_fth1. Sequência *SpyTag* foi clonada na posição N-terminal do gene da proteína pVIII recombinante, logo após sua sequência sinal.



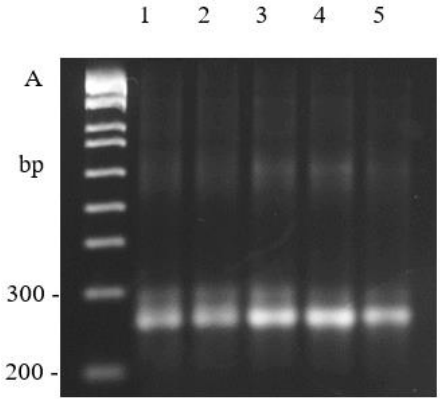
APÊNDICE E - VALORES CQ

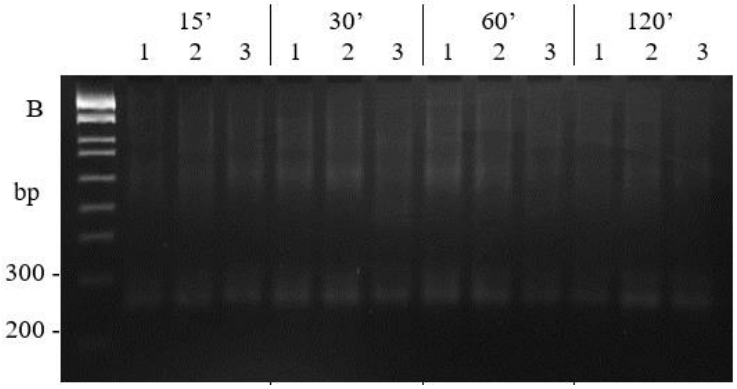
Valores Cq obtidos para cada amostra de plasma após qPCR. Controle = mistura dos clones *SpyTag*_pIII e SVEK sem adição de *SpyCatcher*_ErA. $(ErA)_5$-pIII = mistura dos clones *SpyTag*_pIII e SVEK contendo *SpyCatcher*_ErA. Análise estatística por ANOVA Medidas Repetidas foi usada.

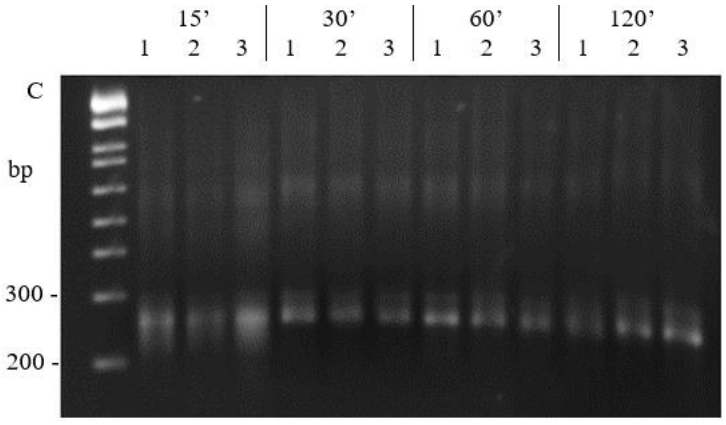


APÊNDICE F - SEGUNDO PCR

Segunda etapa de PCR de amostras de plasma diluído e amostras iniciais. (a) Amostras iniciais. 1 - Mistura dos clones *SpyTag*_pIII e SVEK sem *SpyCatcher*_ErA; 2 - Mistura dos clones *SpyTag*_pIII e SVEK com *SpyCatcher*_ErA; 3 – Mistura *SpyTag*_pIII:SVEK na proporção 1:10; 4 - Mistura *SpyTag*_pIII:SVEK na proporção 1:100; 5 – Mistura *SpyTag*_pIII:SVEK na proporção 1:1000. (b) Amplificação de bacteriófagos isolados do grupo de camundongos tratados com conjugados (camundongos 1, 2 e 3) em diferentes intervalos de tempo (15, 30, 60 e 120 min). (c) Amplificação de bacteriófagos isolados do grupo de camundongos controle (camundongos 1, 2 e 3) em diferentes intervalos de tempo (15, 30, 60 e 120 min).







APÊNDICE G - TITULAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS

Número de bacteriófagos/colônias observadas após plaqueamento de amostras de plasma. M1 = camundongo 1 (controle), M2 = camundongo 2 (controle), M3 = camundongo 3 (controle), M4 = camundongo 1 (*SpyCatcher*_ErA), M5 = camundongo 2 (*SpyCatcher*_ErA), M6 = camundongo 3 (*SpyCatcher*_ErA). # representa o número de placas (para bacteriófagos *SpyTag*_pIII e SVEK) ou número de colônias (para bacteriófagos *SpyTag*_pVIII). FD = fator de diluição. *Medidas foram feitas após 90 minutos ao invés de 60.

	5’		30’		60’		120’	
Phage	#	FD	#	FD	#	FD	#	FD
*SpyTag*_pIII (M1)	265	100000	185	100000	158	100000		
SVEK (M1)	303	100000	216	100000	233	100000		
*SpyTag*_pVIII (M1)	>5000	100	~1500	100	~1500	100		
*SpyTag*_pIII (M2)	357	10000	80	10000	121	10000	80	10000
SVEK (M2)	387	10000	104	10000	119	10000	104	10000
*SpyTag*_pVIII (M2)	~3200	100	>5000	100	~2300	100	~1330	100
*SpyTag*_pIII (M3)	49	100000	34	100000	44	100000	35	100000
SVEK (M3)	45	100000	33	100000	41	100000	41	100000
*SpyTag*_pVIII (M3)	>5000	100	~2300	100	~1200	100	~1340	100
*SpyTag*_pIII (M4)	139	100000	103	100000	27	100000	36	100000
SVEK (M4)	317	100000	253	100000	70	100000	138	100000
*SpyTag*_pVIII (M4)	~2300	100	270	100	68	100	19*	100
*SpyTag*_pIII (M5)	115	100000	72	100000	64	100000	17	100000
SVEK (M5)	281	100000	145	100000	185	100000	110	100000
*SpyTag*_pVIII (M5)	~1440	100	300	100	67	100	32	100
*SpyTag*_pIII (M6)	27	100000	22	100000	146	10000	15	100000
SVEK (M6)	67	100000	46	100000	491	10000	36	100000
*SpyTag*_pVIII (M6)	~700	100	460	100	228	100	192	100

ANEXOS

ANEXO A - FICHA DO ALUNO

03/07/2020

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9134 - 7664171/1 - Guilherme Meira Lima

Email:	guilherme.meira.lima@usp.br
Data de Nascimento:	20/10/1992
Cédula de Identidade:	RG - 49.156.471-5 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2018

Curso:	Mestrado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula:	09/08/2018
Início da Contagem de Prazo:	09/08/2018
Data Limite para o Depósito:	10/08/2020
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Gisele Monteiro - 09/08/2018 até o presente. Email: smgisele@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 09/08/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 02/05/2019
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 09/08/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
Última ocorrência: Prorrogação em 22/06/2020
Impresso em: 03/07/2020 11:59:22

ANEXO A - Ficha do Aluno (CONTINUAÇÃO)

03/07/2020

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9134 - 7664171/1 - Guilherme Meira Lima

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BTC5838-1/1	Estratégias para a Engenharia de Proteínas Terapêuticas Recombinantes (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	15/10/2018	25/11/2018	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5773-8/3	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	11/03/2019	19/05/2019	30	2	100	A	N	Concluída
BTC5743-4/1	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	13/03/2019	25/06/2019	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/8	Aprimoramento Pedagógico	02/04/2019	30/04/2019	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5713-2/3	Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica Industrial	20/05/2019	03/06/2019	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5754-1/3	Da Clonagem à Análise de Proteínas – Métodos e Estratégias (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	26/08/2019	01/09/2019	30	2	100	A	N	Concluída
ICB5751-3/3	As Origens da Biologia Molecular (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	30/03/2020	01/06/2020	120	8	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 22/06/2020
Impresso em: 03/07/2020 11:59:22

ANEXO B - ARTIGO #1

PREPARATIVE BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
2019, VOL. 49, NO. 7, 679–685
https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1599396

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Check for updates

L-Asparaginase from *E. chrysanthemi* expressed in glycoswitch®: effect of His-Tag fusion on the extracellular expression

Brian Effer[a,b], Guilherme Meira Lima[b], Sindy Cabarca[c,d], Adalberto Pessoa[b], Jorge G. Farías[a], and Gisele Monteiro[b]

[a]Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering and Sciences, Universidad de La Frontera, Francisco Salazar, Chile; [b]Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; [c]Department of Microbiology, Laboratory of Applied Structural Biology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; [d]Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

ABSTRACT

L-Asparaginase (L-ASNase) is an important enzyme used to treat acute lymphoblastic leukemia, recombinantly produced in a prokaryotic expression system. Exploration of alternatives production systems like as extracellular expression in microorganisms generally recognized as safe (such as *Pichia pastoris* Glycoswitch®) could be advantageous, in particular, if this system is able to produce homogeneous glycosylation. Here, we evaluated extracellular expression into Glycoswitch® using two different strains constructions containing the *asnB* gene coding for *Erwinia chrysanthemi* L-ASNase (with and without His-tag), in order to find the best system for producing the extracellular and biologically active protein. When the His-tag was absent, both cell expression and protein secretion processes were considerably improved. Three-dimensional modeling of the protein suggests that additional structures (His-tag) could adversely affect native conformation and folding from L-ASNase and therefore the expression and cell secretion of this enzyme.

KEYWORDS

L-Asparaginase; extracellular expression; Glycoswitch; His-tag

ANEXO C - ARTIGO #2

Biochemical Engineering Journal 156 (2020) 107516

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bej

Regular article

Glycosylation of L-asparaginase from *E. coli* through yeast expression and site-directed mutagenesis

Guilherme Meira Lima[a], Brian Effer[a,b], Henrique Pellin Biasoto[a], Veronica Feijoli[c], Adalberto Pessoa[a], Giuseppe Palmisano[c], Gisele Monteiro[a,*]

[a] Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
[b] Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering and Sciences, University of La Frontera, Temuco, Chile
[c] Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

HIGHLIGHTS

- WT L-ASNase expressed in yeast was successfully glycosylated, secreted and purified.
- The yeast strain was able to glycosylate all glycosylation sites of WT L-ASNase.
- Mutations at L-ASNase glycosylation sites influenced its biological properties.
- Mutated L-ASNase showed a significant increase in biological activity relative to WT.
- Glycosylation increases L-ASNase stability and masks immunogenic epitopes.

ARTICLE INFO

Keywords:
Site-directed mutagenesis
Asparaginase
Glycosylation
Biopharmaceutical
Biologics
Yeast

ABSTRACT

L-Asparaginase (L-ASNase) is a key component in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), but several clinical disadvantages, such as immunogenicity and rapid clearance, are still present. We evaluated the possibility to synthesize a new L-ASNase from *Escherichia coli* with human-like glycosylation and study the glycosylation effect on the biochemical properties of the enzyme. Six L-ASNase mutants were also created in which L-ASNase glycosylation sites were removed through site-directed mutagenesis. The WT L-ASNase was successfully expressed, secreted and glycosylated by an engineered *P. pastoris* strain and presented predominantly $Man_5GlcNAc_2$ glycans on its structure, which were then able to decrease L-ASNase immunogenicity *in vitro*. The purified glycosylated L-ASNase has shown a 30-fold decrease in specific enzymatic activity compared to the non-glycosylated proteoform, but a triple mutant L-ASNase (3M) was able to restore L-ASNase biological activity to significant levels. 3M accumulated in the yeast periplasmic space and there presented a 28-fold increase in enzymatic activity when compared to the fully glycosylated proteoform. Both WT and 3M L-ASNases presented increased stability in human serum compared to non-glycosylated L-ASNase. This study demonstrates the important effects of glycosylation on L-ASNase properties and opens up new possibilities to use glycosylated L-ASNases for the treatment of ALL.

ANEXO D - ARTIGO #3

ARTICLE IN PRESS

Blood Reviews xxx (xxxx) xxxx

Contents lists available at ScienceDirect

Blood Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/blre

Review

Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer

T.A. Costa-Silva*, I.M. Costa, H.P. Biasoto, G.M. Lima, C. Silva, A. Pessoa, G. Monteiro*

Department of Pharmaceutical and Biochemical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
L-asparaginase
L-asparagine blood depletion
Enzyme clinical application
Acute lymphoblastic leukemia (ALL)
Anticancer enzyme
Cytotoxicity assays

ABSTRACT

L-asparaginase is an enzyme used as a biopharmaceutical to treat acute lymphoblastic leukemia. Several adverse effects have been related to L-asparaginase use, so the scientific community has searched for novel proteoforms of L-ASNase. However, some critical characteristics must be considered for a novel L-ASNase source to be effective as an antitumour drug. Accordingly, this article provides a critical analysis of the parameters and methods applied to estimate L-ASNase concentration, measure the L-ASNase and GLNase activities and kinetics, evaluate the enzyme preparations purity and define the antitumour activity against leukemic cells in vitro. Among the main features, the proposed new enzyme needs to present high affinity for L-asparagine; low percentage of glutaminase activity in relation to L-ASNase; high enzyme stability and half-life and mainly antileukemic activity when a low protein amount is applied. These parameters are discussed in an attempt to guide the consideration of an enzyme as a promising biopharmaceutical against ALL.

ANEXO E - ARTIGO #4 (EM ANÁLISE – SCIENTIFIC REPORTS)

Extracellular expression of *Saccharomyces cerevisiae*'s L-asparaginase II in *Pichia pastoris* results in novel enzyme with better parameters

Henrique P. Biasoto[1], Cristina B. Hebeda[2], Sandra H. P. Farsky[2], Adalberto Pessoa[1], Guilherme M. Lima[1], Gisele Monteiro[1*].

[1]Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP – Brazil;

[2]Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP – Brazil.

*To whom the correspondence should be addressed: Gisele Monteiro: smgisele@usp.br; Tel. +551130913734.

Abstract

L-asparaginase (ASNase) is an efficient tumor growth inhibitor, used in chemotherapy sessions against acute lymphoblastic leukemia; its use results in 80% complete remission of the disease in treated patients. *Saccharomyces cerevisiae*'s L-asparaginase II (ScASNaseII) has a great potential to be used in patients who developed hypersensitivity to bacterial ASNases, but endogenous expression of ScASNaseII results in production of a hypermannosylated and immunogenic enzyme. Here we describe the development of an expression-secretion system to produce and secrete the ScASNaseII enzyme into the culture medium. Our strategy involved the fusion of the sequence of the protein codified by the *ASP3* gene with the secretion signal sequence of the *P. pastoris* acid phosphatase enzyme. The resulting vector was integrated into the *P. pastoris* Glycoswitch strain genome, which is able to express and secrete large amounts of enzyme with human-like glycosylation. Our data show that the DNA construction and the strain employed can express the extracellular ASNase with a specific activity of 218.2 $IU.mg^{-1}$. The resultant enzyme is 40% more stable than a commercially available *Escherichia coli's* ASNase (EcASNaseII) when incubated with human serum. In addition, ScASNaseII presented 50% lower cross-reactivity to anti-ASNase antibody produced against EcASNaseII when compared with ASNase from *Dickeya chrysanthemi*.

Keywords: pharmaceutical biotechnology; biopharmaceutical; enzyme purification; acute lymphoid leukemia; antileukemic; extracellular expression.

ANEXO F - ARTIGO #5 (EM ELABORAÇÃO)

MULTIVALENT DISPLAY OF L-ASPARAGINASE ON BACTERIOPHAGES USING THE SPYTAG/SPYCATCHER SYSTEM AS A TOOL TO *IN VIVO INVESTIGATION*

Guilherme M. Lima[1,2], Alexey Atrazhev[2], Susmita Sarkar[2], Mirat Sojitra[2], Revathi Reddy[2], Matthew S. Macauley[2,3], Gisele Monteiro[1*], and Ratmir Derda[2*]

[1]Departmento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 05508 000, Brazil
[2] Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2G2, Canada;
[3] Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2G2, Canada

* These authors have the same contribution. Corresponding authors: smgisele@usp.br, ratmir@ualberta.ca

Abstract

Phage display is a powerful method used in the discovery and development of peptides and proteins with desired chemical, pharmaceutical and biological properties. Display of large multi-subunit proteins on phages, however, remains a challenge. Here, we describe a method of covalently linking L-asparaginase fused to SpyCatcher (SpyCatcher_ASNase), a ~200 kDa tetrameric protein, to M13 and fd filamentous phages displaying SpyTag either at the N-terminus position of the pIII minor coat protein (SpyTag_pIII) or the N-terminus position of the pVIII major coat protein (SpyTag_pVIII), respectively. About 50 copies of SpyCatcher_ASNase could be displayed on the surface of a recombinant pVIII protein from a fd-type filamentous phage compared to the 5 copies commonly offered by pIII display. SpyCatcher_ASNase remained active after conjugation to either phage and could be easily purified directly from bacterial culture lysates through PEG/NaCl precipitation. These different pure bioconjugates were applied in mice; titering and deep-sequencing of protein-phage conjugates obtained from plasma mice samples revealed no significant decrease of protein-phage conjugates from SpyTag_pIII phages in 2 hours. However, titering of the higher-copy number protein-phage conjugates from SpyTag_pVIII phages revealed a higher ASNase clearance within the same time frame. In conclusion, biological conjugation of L-asparaginase to filamentous phage proved successful and could be used as means to monitor L-ASNase clearance *in vivo* through phage sequencing and phage titering.

ANEXO G - PÔSTER

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

LIII SUPFAI

XXIII SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
LIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica
X Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas
XVIII Campanha de Diabetes

CERTIFICADO

Certificamos que **GUILHERME MEIRA LIMA** apresentou o trabalho "CLONING AND EXPRESSION OF L-ASPARAGINASE FROM Escherichia coli IN A Pichia pastoris STRAIN WITH HUMANIZED GLYCOSYLATION", de autoria de GUILHERME MEIRA LIMA 1 (IC), BRIAN EFFER 1,2 (D), GISELE MONTEIRO1, em forma de pôster, durante a XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, realizada no período de 22 a 31 de outubro de 2018.

São Paulo, 26 de outubro de 2018.

Profa. Dra. Jeanine Giarolla Vargas
Presidente da Comissão de Avaliação de Pôsteres

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Presidente da Comissão Organizadora

ANEXO H - IGEM

iGEM 2018
INTERNATIONAL GENETICALLY ENGINEERED MACHINE COMPETITION
GUILHERME MEIRA LIMA
USP-BRAZIL
BEST MEASUREMENT
OVERGRADUATE
GIANT JAMBOREE
OCTOBER 24 - OCTOBER 28, 2018
BOSTON, MASSACHUSETTS

ANEXO I - APROVAÇÃO CIBIO

UNVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança

Of.CIBio/0042019/FCF

São Paulo, 07 de fevereiro de 2019.

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que em reunião da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas realizada nesta data., o Projeto "*Expressão de L-Asparaginase de Erwinia chrysanthemi em Tecnologia de Síntese Proteica Livre de Células*" foi aprovado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. JOÃO CARLOS MONTEIRO DE CARVALHO
Presidente da CIBio

Ilma. Sra.
Profa. Dra. GISELE MONTEIRO
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF-USP
NESTA

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone (011) 3091-3042 - e-mail: atadfcf.usp.br