UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Caracterização de L-Asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* melhorada por evolução sintética de proteínas e otimização das condições de produção.

Débora Custodio

São Paulo

2018

Débora Custodio

Caracterização de L-Asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* melhorada por evolução sintética de proteínas e otimização das condições de produção.

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Tecnologia de Fermentações

Orientadora: Profª Dra. Gisele Monteiro
Co-orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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 USP

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

C987c

Custodio, Débora
Caracterização de L-Asparaginase de Erwinia chrysanthemi melhorada por evolução sintética de proteínas e otimização das condições de produção / Débora Custodio. - São Paulo, 2018.
108 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Monteiro, Gisele
Coorientador: J?nior, Adalberto Pessoa

1. Biotecnologia Farmcêutica. 2. Leucemia. 3. Enzima. 4. Mutação. I. T. II. Monteiro, Gisele, orientador. III. Júnior, Adalberto Pessoa, coorientador.

Débora Custodio

Caracterização de L-Asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* melhorada por evolução sintética de proteínas e otimização das condições de produção

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora.

Aprovado em:

Banca examinadora

Profª Dra. Gisele Monteiro

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

São Paulo, de de 2018.

AGRADECIMENTOS

À Profº Dra Gisele Monteiro, primeiramente pela oportunidade e confiança de ter me aceitado como aluna. Também pelo apoio, dedicação e ensinamentos que contribuíram imensamente para meu crescimento intelectual. Agradeço à “Gi”, pelas conversas, risadas e por ter sido muito mais que uma professora.

Ao Profº Adalberto Pessoa Junior, que contribuiu de maneira essencial para o crescimento nesse projeto, de mestrado à doutorado direto, e por ter aceitado ser meu co-orientador.

Aos professores e colegas do Semi Industrial, pela convivência ao longo desses anos.

Aos meus colegas do laboratório Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica, pelo auxílio e incentivo. Em especial agradeço à Íris, Marcela e Karen, pela imensa contribuição no meu trabalho e também pela amizade.

Ao meu pai Joaquim, à minha mãe Neusa e minha irmã Raquel por terem sempre acreditado, incentivado e me ajudado a realizar meus sonhos.

Ao meu marido Bruno, pelo carinho e incentivo incansável.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes pela concessão de bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro ao Projeto Temático 2013/ 08617-7 e pela concessão de bolsa de doutorado direto 2015/24463-5.

RESUMO

CUSTODIO, D. **Caracterização de L-Asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* melhorada por evolução sintética de proteínas e otimização das condições de produção**

A L-Asparaginase (L-ASNase) é uma enzima tetramérica bacteriana, utilizada em sessões de quimioterapia. Essa enzima depleta os aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln), transformando-os em aspartato (Asp) ou glutamato (Glu), respectivamente, e em amônia. Contudo, a L-ASNase pode induzir resposta imune, levando à produção de anticorpos antiasparaginase, uma causa importante de resistência ao medicamento. Uma L-ASNase ideal seria aquela com alta atividade e estabilidade e baixo potencial imunogênico, porém, as L-ASNases utilizadas na terapêutica não reúnem essas características simultaneamente. Por essa razão, o presente trabalho utilizou técnicas de mutagênese randômica, a fim de criar uma nova proteoforma de L-ASNase de *E. chrysanthemi* com uma melhor atividade e estabilidade. Além disso, foram estudadas condições de cultivo em agitador metabólico, visando à otimização de condições de produção. Foi criada uma biblioteca com 1.056 clones, e desses, 19 foram selecionados por apresentarem atividade superior ou igual à enzima selvagem quando dosada em extrato bruto. Dentre eles, dois mutantes se destacaram por apresentarem a atividade específica glutaminásica diferente da enzima selvagem. Análises *in silico* indicam que o mutante 9-6D apresentou diminuição de desordem estrutural e epítopos imunogênicos. O mutante 9-5F demonstrou uma diminuição da porcentagem da atividade glutaminásica quando comparada a enzima selvagem. O estudo de produção do mutante 9-5F indicou que a temperatura de indução, seguida da concentração do indutor, são os parâmetros mais relevantes para a otimização da produção de L-ASNase de *E. chrysanthemi* mutante.

Palavras-chave: epPCR, evolução sintética de proteínas, biofármaco, leucemia linfoide aguda.

ABSTRACT

CUSTODIO, D. **Characterization of *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase improved by synthetic protein evolution and optimization of production conditions**

L-Asparaginase (L-ASNase) is a bacterial tetrameric enzyme used in chemotherapy sessions that deplete asparagine (Asn) and glutamine (Gln), transforming them into Aspartate (Asp) or glutamate (Glu), respectively, and ammonia. However, L-ASNase can induce immune response leading to the production of anti-asparaginase antibody, an important cause of drug resistance. Ideally, L-ASNase would be one with high activity, high stability and low immunogenic potential, but the L-ASNases commercially available today do not present these characteristics simultaneously. For this reason, this study used techniques of random and site-directed mutagenesis in order to create a new proteoform of *E. chrysanthemi* L-ASNase with improved activity and stability. In addition, culture conditions were studied in a metabolic shaker, aiming at the optimization of production conditions. A library with 1,056 clones was created, and of these clones, 19 were selected because they had activity superior or equal to the wild-type enzyme in crude protein extract. Among them, 2 mutants stood out for having different glutaminase specific activity in relation to wild-type enzyme. The 9-6D mutant also showed decreased structural disorder and immunogenic epitopes. The 9-5F mutant demonstrated a decrease in percentage of glutaminase activity when compared to the wild-type enzyme. The production study of 9-5F mutant indicated that the induction temperature followed by the inductor concentration are the most relevant parameters for the production optimization of *E. chrysanthemi* mutant L-ASNase.

Keywords: epPCR, synthetic protein evolution, biopharmaceutical, acute lymphoid leukemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema dos passos metodológicos seguidos para a produção da biblioteca de mutantes.....34

Figura 2. Esquema da conformação das placas para a criação da biblioteca de mutantes.....39

Figura 3. Esquema da sequência metodológica para a confirmação e seleção dos mutantes obtidos produzidos por epPCR.....40

Figura 4. Esquema das metodologias utilizadas para a seleção da enzima mais promissora.....44

Figura 5. Desenho dos procedimentos experimentais para a caracterização da enzima recombinante selecionada.....48

Figura 6. Desenho dos procedimentos experimentais para a otimização de parâmetros para a produção de enzima recombinante.....51

Figura 7. Esquema da metodologia da construção de uma enzima de tamanho reduzido.....55

Figura 8. Distribuição e frequência de mutações. Distribuição dos clones selecionados de acordo com a presença ou não de mutação resultante em alteração de aminoácidos da proteína.....59

Figura 9. Valor de atividade específica calculada a partir da fração periplasmática de cada mutante.....60

Figura 10. Cromatogramas de purificação da enzima selvagem por troca catiônica e exclusão molecular.....61

Figura 11. Verificação da purificação das enzimas. SDS-PAGE de enzima selvagem.....62

Figura 12. Atividade específica asparaginásica e atividade glutaminásica do mutante 9-5F.....65

Figura 13. Representação das simulações realizadas em PONDR®-VLXT para a enzima selvagem e a enzima mutante 9-6D.....68

Figura 14. Representação das simulações realizadas em PONDR®-VSL2 para a enzima selvagem e a enzima mutante 9-6D.....69

Figura 15. Representação das simulações realizadas em IEDB para a enzima selvagem e a enzima mutante 9-6D.....71

Figura 16. SDS-PAGE das enzimas selvagem, 9-5F e 9-6D após incubação com AEP e CTSB.....74

Figura 17. Modelo estrutural cristalográfico da enzima mutante 9-5F.....77

Figura 18. Porcentagem de atividade específica residual em função do tempo, de acordo com a temperatura de armazenamento da enzima mutante 9-5F....80

Figura 19. Atividade específica asparaginásica e glutaminásica da enzima mutante 9-5F, de acordo com pH utilizado para a realização da reação de hidrólise.....80

Figura 20. Porcentagem de atividade glutaminásica da enzima mutante 9-5F, de acordo com pH utilizado para a realização da reação de hidrólise.....81

Figura 21. Atividade específica asparaginásica e glutaminásica da enzima mutante 9-5F, de acordo com temperatura utilizada para a realização da reação de hidrólise.....82

Figura 22. Porcentagem de atividade glutaminásica da enzima mutante 9-5F, de acordo com a temperatura utilizada para a realização da reação de hidrólise.....83

Figura 23. Atividade específica asparaginásica residual da enzima mutante 9-5F após tratamento térmico.....84

Figura 24. Curva de crescimento celular do mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*) em diferentes meios de cultivo.....85

Figura 25. Produtividade específica e volumétrica do mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3*)).....88

Figura 26. Média da produtividade específica (A) e da produtividade volumétrica (B) de acordo com a temperatura de indução para o mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*).....89

Figura 27. Atividade específica obtida em cada condição avaliada para o mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*).....90

Figura 28. Modelo estrutural cristalográfico do monômero de ErA.....92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo.....33

Tabela 2. Tabela adaptada representando a taxa de mutações previstas utilizando o kit *GeneMorph® Random Mutagenesis.*.....37

Tabela 3. Condições para otimização da fase de indução durante o crescimento do mutante selecionado.....53

Tabela 4. Denominação dos clones selecionados e as respectivas mutações (substituição de aminoácidos).....59

Tabela 5. Valor da atividade específica asparaginásica e glutaminásica correspondente às proteínas recombinantes purificadas.....63

Tabela 6. Pontuações referentes a regiões imunogênicas obtidas pelo IEDB da enzima selvagem e da mutante 9-6D.....72

Tabela 7. Valores de atividade específica calculadas pelo método de ensaio acoplado à GDH.....78

Tabela 8. Parâmetros cinéticos das atividades asparaginásica e glutaminásica das enzimas selvagem e mutante 9-5F.....78

Tabela 9. Comparação entre os valores obtidos de atividade específica (U/mg de proteína), produtividade específica (U/g célula) e produtividade volumétrica (U/L de meio cultivado) resultante do crescimento do mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*) em diferentes velocidades de agitação (rotatória).....86

Tabela 10. Resultados da produtividade específica (U/g de célula), da produtividade volumétrica (U/L de meio) e da atividade específica (U/mg de proteína total) obtidos para o mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*), de acordo com a condição analisada.....87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEP	asparaginil endopeptidase
L-ASNase	L-Asparaginase
ASNS	asparagina sintetase
BSA	albumina de soro bovino (do inglês, bovine serum albumin)
CCD	do inglês, central composite design
CTSB	Catepsina B
dNTPs	desoxirribonucleotídeo-trifosfatos
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
epPCR	PCR propensa a erro
EcA	L-ASNase derivada de *E. coli*
ErA	L-ASNase derivada de *E. chrysanthemi*
FDA	do inglês, Food and Drug Administration
FPLC	do inglês, fast protein liquid chromatography
GS	glutamina sintetase
IBP1	do inglês, Insulin-like growth factor-binding protein 1
IM	Intramuscular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPTG	indutor isopropril-β-D-1-tiogalactopiranosideo
IV	intravenosa
K_M	constante de Michaelis-Menten
LB	do inglês, Lysogeny Broth
LLA	leucemia linfoide/linfoblástica aguda
LMA	leucemia mieloide aguda
MS	Ministério da Saúde
OD	densidade ótica
PCR	do inglês, Polymerase Chain Reaction
PDB	do inglês, Protein Data Bank
pET15b	vetor plasmidial da empresa Novagen
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoreto
PONDR	do inglês, Predictor of Natural Disordered Regions
PSA	persulfato de amônio
RSM	do inglês, Response Surface Methodology

SB	do inglês, Super Broth
SB3	do inglês, Super Broth 3
SDS-Page	do inglês, Eletroforese de Gel de Poliacrilamida e Dodecil Sulfato de Sódio
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	do inglês, Terrific Broth
TB5	do inglês, Terrific Broth 5
Temed	tetrametiletilenodiamina
Tris	2-amino-2-hidroximetil-Propano-1,3-Diol
TY	do inglês, Tryptone Yeast
X	Biomassa (g de massa seca por L)

ABREVIATURA E SIGLAS DOS AMINOÁCIDOS

A	Ala	alanina
C	Cys	cisteína
D	Asp	aspartato
E	Glu	glutamato
F	Phe	fenilalanina
G	Gly	glicina
H	His	histidina
I	Ile	isoleucina
K	Lys	lisina
L	Leu	leucina
M	Met	metionina
N	Asn	asparagina
P	Pro	prolina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
S	Ser	serina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
W	Trp	triptofano
Y	Tyr	tirosina

LISTA DE UNIDADES

cm	centímetro
ºC	graus Celsius
g	aceleração gravitacional
g	grama
µg	micrograma
h	hora
kb	kilobase
kDA	kilo Dalton
kV	kilovolts
L	litro
mL	mililitro
µL	microlitro
mg	miligrama
M	molar
mM	milimolar
nM	nanomolar
rpm	rotações por minuto
s	segundos
U	unidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21

1.1.Contextualização 21

1.2.Leucemia Linfoide/Linfoblástica Aguda (LLA) 22

1.3. L-Asparaginase (L-ASNase) 23

1.4. L-ASNase de E. chrysanthemi (ErA) 25

1.5. Variabilidade genética e mutações aleatórias 26

1.6. Fatores que influenciam a produção de proteína recombinante 29

2. OBJETIVOS 30

2.1.Objetivo Geral 30

2.2.Objetivos Específicos 31

3. MATERIAIS E MÉTODOS 31

3.1.Materiais 31

3.2. Obtenção da proteína ErA Selvagem 33

3.2.1. Construção do vetor de expressão da ErA 33

3.3. Produção da biblioteca de clones mutados randomicamente 34

3.3.1. Desenho de iniciadores 34

3.3.2. Obtenção do plasmídeo pET15b+asnB 35

3.3.3. Amplificação de asnB para molde da epPCR 36

3.3.4. Mutagênese randômica por PCR propensa a erros (epPCR) 36

3.3.5. Digestão e ligação 37

3.3.6. Transformação e plaqueamento 38

3.3.7. Construção da biblioteca de clones mutantes 38

3.4. Seleção dos mutantes 39

3.4.1. Crescimento celular em placas 40

3.4.2. Choque osmótico 41
3.4.3. Determinação da atividade enzimática com reagente de Nessler ... 41
3.4.4. Reação de sequenciamento 42
3.4.5. Análise do sequenciamento 43
3.4.6. Seleção dos mutantes 43
3.5. Seleção da enzima mais promissora 44
3.5.1. Expressão e purificação das proteínas selecionadas 44
3.5.2. Gel SDS-PAGE 45
3.5.3. Determinação da atividade específica 46
3.5.4. Verificação de regiões desordenadas 46
3.5.5. Análise de epítopos imunogênicos 47
3.5.6. Determinação da estabilidade enzimática frente às proteases sanguíneas 47
3.6. Caracterização da enzima selecionada 48
3.6.1. Análise bioinformática da proteína 49
3.6.2. Determinação da atividade enzimática pelo ensaio acoplado à Glutamato Desidrogenase 49
3.6.3. Determinação dos parâmetros cinéticos 50
3.6.4. Determinação da temperatura e do pH ótimos na atividade enzimática 50
3.6.5. Estudo da termo estabilidade da enzima 50
3.7. Otimização de parâmetros de cultivo em agitador metabólico 51
3.7.1. Avaliação do crescimento celular em diferentes meios de cultivo ... 52
3.7.2. Estudo da velocidade de agitação 52
3.7.3. Estudo de variáveis na fase de indução 53
3.7.4. Verificação da atividade específica e produtividade 53
3.7.5. Escolha dos parâmetros de produção da enzima recombinante em escala laboratorial 54

3.8. Criação da estrutura reduzida da ErA 55
3.8.1. Desenho de iniciadores para ErA reduzida 55
3.8.1. Mutação sitio-dirigida 55
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO 56
4.1. Obtenção da ErA selvagem 56
4.2. Produção e triagem da biblioteca de mutantes 57
4.3. Avaliação da atividade específica 59
4.4. Avaliação da desordem estrutural 65
4.5. Análise dos epítopos imunogênicos 70
4.6. Avaliação da resistência a proteases 72
4.7. Seleção do clone mais promissor 74
4.8. Caracterização da enzima selecionada 77
4.9. Otimização de parâmetros na produção de ErA 84
4.10. Construção da ErA de tamanho reduzido 91
5. CONCLUSÕES 92
6. PERSPECTIVAS 92
REFERÊNCIAS 93
ANEXO 1. APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA 105
ANEXO 2. FICHA DO ALUNO 106

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização

Apesar de sua modesta participação de 3% na produção mundial de medicamentos, o Brasil tem relevância crescente tanto para a indústria convencional quanto para a biofarmacêutica, por ser o 6º maior mercado consumidor. Além disso, os produtos de origem biotecnológica já respondem pela maior parcela das despesas do Sistema Único de Saúde (SUS) com medicamentos (ABIFINA, 2014).

A edição da Portaria MS nº 1284 abriu as portas do sistema público de saúde à indústria nacional de biomedicamentos, e as políticas públicas têm atuado de forma coordenada para acelerar a convergência tecnológica por meio de três variáveis principais: poder de compra, regulação e financiamento. Entretanto, o desafio de conjugar o atendimento dessa demanda com as diretrizes estabelecidas de autonomia tecnológica pelo programa Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo ainda está distante de ser vencido (ABIFINA, 2014).

Segundo SOUZA (2012), a continuidade do fornecimento de medicamentos utilizados em oncologia, em especial onco-hematologia, tem sido causa de grande apreensão desde o ano de 2011, pois a oferta de muitos fármacos foi interrompida. Dentre esses medicamentos está a asparaginase (L-ASNase), utilizada em protocolos para o tratamento de Leucemia Linfoide/Linfoblástica Aguda (LLA). Existiu um planejamento para a produção desse medicamento no Brasil até 2015 (CANAL FIOCRUZ), mas que infelizmente não ocorreu.

A situação no ano de 2017 ainda era complicada. O Ministério da Saúde emitiu uma nota à imprensa, em 05/04/2017, publicada no Portal da Saúde (http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/27975-ministerio-fez-consulta-mundial-para-compra-de-asparaginase) informando que até o momento da publicação da nota, não havia nenhuma empresa que possuísse registro da L-ASNase no Brasil e para evitar o desabastecimento do medicamento, foi realizada uma cotação internacional.

É notório que tanto a biotecnologia tradicional quanto a biotecnologia moderna são altamente promissoras no desenvolvimento de medicamentos inovadores como os anticancerígenos (ABIFINA, 2013). O desenvolvimento nacional dessas tecnologias tem se tornado premente para o país, tanto no âmbito da independência tecnológica, quanto diretamente na saúde da população.

1.2. Leucemia Linfoide/Linfoblástica Aguda (LLA)

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) no ano de 2016 estimou 5.540 novos casos de leucemia em homens e 4.530 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,63 novos casos a cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2015). Considerando a LLA no mundo, aproximadamente 60% dos casos ocorrem em pessoas com idade inferior a 20 anos (CHEN S-H, 2015).

Recentes avanços em quimioterapia intensiva e cuidados adequados trouxeram melhorias significativas no tratamento da LLA, de modo que aproximadamente 80% das crianças apresentam remissão completa da doença após o tratamento (CHEN S-H, 2015). A LLA em crianças evolui muito rapidamente, de forma que a interrupção ou o adiamento de qualquer etapa da terapia implica em prejuízo irremediável no prognóstico que atualmente é de grande eficácia (INCA, 2011). Existem vários protocolos oncológicos para o tratamento de LLA infanto-juvenil que variam conforme a classificação no grupo de risco. Os protocolos são compostos por combinações de vários quimioterápicos (poliquimioterapia) como: metotrexato, vincristina, doxorrubicina, ciclofosfamida, tioguanina, ifosfamida, corticoides e L-ASNase (Condutas do INCA LLA, 2011).

Células malignas, tumorais ou neoplásicas são diferentes das células normais do organismo por apresentarem mutações em seu material genético, o que pode gerar alterações em diversas funções celulares. As LLAs são caracterizadas por intensa multiplicação e grande número de células das linhagens linfoide e mieloide imaturas na corrente sanguínea. A LLA apresenta

malignidades agressivas em crianças (sobretudo de 3 a 5 anos) e adolescentes (AVRAMIS, 2012).

As células cancerosas demandam mais energia química e substrato para geração de produtos. Os aminoácidos asparagina (L-asparagina, Asn ou N) e glutamina (L-glutamina, Gln ou Q) não são reconhecidos como essenciais na alimentação, pois muitas células são capazes de sintetizá-los. No entanto, são fundamentais para o funcionamento neural e sobrevivência de células cancerosas, servindo de fonte de carbono e nitrogênio, além do uso na síntese proteica em condições de alta proliferação celular. Para as células leucêmicas, a presença de Asn no meio extracelular e sua absorção são imprescindíveis (HAMERCHLAK, 2008).

1.3. L-Asparaginase (L-ASNase)

A L-ASNase, descoberta em 1953 por Kidd, é um inibidor eficiente do crescimento tumoral. A L-ASNase é uma enzima tetramérica, utilizada em sessões de quimioterapia, que hidrolisa Asn e Gln, transformando-os em aspartato ou glutamato, respectivamente, e em amônia. Desde 1970, a L-ASNase tornou-se um componente essencial na quimioterapia para o tratamento de LLA infantil. EGLER et al. (2016) fizeram uma comparação de protocolos de tratamento com e sem L-ASNase, revelando que o desfecho clínico foi melhorado em todos aqueles que incorporaram a L-ASNase.

Muitos blastos de leucemia e células da medula não têm ou possuem baixos níveis de asparagina sintetase (ASNS), por isso o aminoácido Asn é fornecido pelo meio extracelular para produção de proteínas, contribuindo de forma essencial para o crescimento dessas células tumorais (NARTA et al., 2007; RAETZ & SALZER, 2010; DOUER, 2008). A diminuição desses aminoácidos para as células leucêmicas leva à inibição da síntese de proteínas constitutivas, além de proteínas regulatórias fundamentais como as do ciclo celular (quinases dependentes de ciclinas [cdKs] e ciclinas) e proteínas antiapoptóticas, resultando em morte celular. Alguns estudos sugerem, ainda, que por causar efeitos drásticos nas células tumorais, as L-ASNases devem depletar outros aminoácidos (AVRAMIS, 2012; NOMME et al., 2012).

Considerando o fato de que proteínas também são responsáveis pela regulação de genes envolvidos no crescimento celular, na síntese proteica e no metabolismo de aminoácidos, alterações da concentração plasmática de Asn e Gln levam à hiper-regulação da expressão da asparagina sintetase (ASNS), da glutamina sintetase (GS) e de oncogenes como *c-JUN*, *c-FOS* e *BCL-2*. Estudos indicam que a queda drástica da concentração de Gln inicia nas mitocôndrias uma cascata intrínseca de apoptose e resulta em morte celular após 2 horas (AVRAMIS, 2012).

A L-ASNase pode induzir resposta imune, produzindo anticorpos antiasparaginase. Estes são as principais causas de resistência ao medicamento resultando na redução de sua atividade. A resistência à L-ASNase pode ser sintomática, com sinais de hipersensibilidade clínica, ou assintomática. Os sintomas incluem urticária, erupções, prurido, eritema, edema, bronco espasmos, hipotensão e ocasionalmente choque anafilático (raros casos). O uso de medidas profiláticas, como corticoides e anti-histamínicos, não é aconselhável, pois esses podem mascarar os sintomas de inativação do biofármaco. Outros efeitos adversos relatados são: disfunção hepática, alterações na coagulação sanguínea, diarreia, vômito, pancreatite, supressão da medula óssea, hiperglicemia e baixos níveis séricos de antitrombina III e fibrinogênio (NARAZAKI et al., 2012; AVRAMIS, 2012).

De acordo com PATEL et al. (2009), as proteases produzidas por linfoblastos são as principais responsáveis por clivar e inativar L-ASNases bacterianas, o que pode potencializar o desenvolvimento de reações alérgicas. A melhoria da estabilidade das L-ASNases frente às proteases poderia colaborar com a diminuição de reações alérgicas e ainda evitar a perda da atividade da enzima.

Existem três formas de L-ASNases terapeuticamente utilizadas por estarem disponíveis comercialmente e aprovadas pelos órgãos regulatórios de saúde: a L-Asparaginase nativa (EcA) e a L-Asparaginase peguilada (PEG-asparaginase), que possui ligação covalente com um grupo polietileno glicol, ambas obtidas de *E. coli*; e a L-Asparaginase obtida de *Erwinia chrysanthemi* (ErA) – atualmente denominada de *Dickeya chrysanthemi* - (Crisantaspase), (CORTIJO-CASCAJARES et al., 2012). Os três tipos possuem o mesmo mecanismo de ação, depleção de Asn, mas diferem em suas propriedades

farmacocinéticas (RIZZARI et al., 2013). Desde então, muitas L-ASNases derivadas de diversos outros micro-organismos foram caracterizadas, mas a escolha da L-ASNase mais adequada para o tratamento tem sido um dilema para a comunidade científica e médica. Diferenças na farmacocinética, hipersensibilidade imunológica, doses, preços, farmacodinâmica entre outros fatores são levados em consideração para a enzima ser comercializada e indicada para terapêutica (RIZZARI et al., 2013; RAETZ & SALZER, 2010). Os principais fatores que influenciam a atividade antileucêmica da L-ASNase são os bioquímicos (atividade de hidrólise, K_M da enzima, atividade excessiva de glutaminase) e os farmacológicos (depuração sérica da enzima e desenvolvimento de resistência à L-ASNase) (AVRAMIS, 2012).

1.4. L-ASNase de *E. chrysanthemi (*ErA*)*

A ErA é indicada para aqueles pacientes que desenvolveram hipersensibilidade à EcA ou PEG-ASNase (EGLER et al. 2016). As reações de hipersensibilidade, devido à produção de anticorpos, têm sido observadas em 60% dos pacientes que fazem uso da enzima derivada de *E. coli*. A fim de reduzir a reação adversa causada pela quimioterapia, desenvolveu-se a PEG-L-ASNase (enzima conjugada com polietileno glicol) que apresenta, ainda, a vantagem de ter um período de meia-vida biológico maior que EcA (PIETERS et al., 2011). A meia-vida aumentada pode ser atribuída ao menor reconhecimento por proteases séricas, bem como menor filtração glomerular, devido ao aumento de massa molar da enzima peguilada. Todavia, é comprovada a existência de reação-cruzada entre anticorpos desenvolvidos nos pacientes previamente tratados com EcA e PEG-L-ASNase, inviabilizando a mudança de uma para outra. A alternativa quando há reação a alguma das formulações de *E. coli* é substituí-la por *Crisantaspase* (ErA). Essa última não apresenta reação-cruzada com anticorpos antiasparaginase produzidos contra a enzima de *E. coli* (PIETERS et al., 2011; RIZZARI et al., 2013). Assim, muitos pacientes que de outra forma teriam de interromper o tratamento com L-ASNases são capazes de completá-lo usando Crisantaspase (BURKE, 2014).

A ErA é capaz de hidrolisar a Asn e Gln com pouca estimulação do sistema imune, mas apresenta meia-vida biológica menor e atividade glutaminásica maior que as outras formulações provindas de *E. coli*. Com relação ao tempo de meia-vida após a administração Intramuscular (IM) foram encontrados valores de atividade sérica após 1,28; 5,73 e 0,65 dias para as EcA, PEG-ASNase e a ErA, respectivamente (EGLER et al., 2016).

Vários investigadores procuram reduzir a atividade glutaminásica das L-ASNases para diminuir a toxicidade, mas estudos recentes demonstraram que a atividade glutaminásica é muito importante para a efetividade da ação citotóxica de celúlas leucêmicas (PARMENTIERA et al., 2015).

Embora a ErA tenha sido utilizada no tratamento da LLA da infância durante várias décadas, permanece a variabilidade na prática com respeito à dosagem ótima, intervalo de aplicação e via de administração. A administração intravenosa (IV) tem sido rotineiramente utilizada na Europa em doses de 20.000 UI/m² três vezes por semana. O doseamento intramuscular (IM) indicado pela FDA (*Food and Drug Administration*) da ErA é de 25.000 UI/m² três vezes por semana. Embora a administração IM tenha sido amplamente utilizada nos Estados Unidos, a ErA também está aprovada para uso IV (EGLER et al. 2016).

1.5. Variabilidade genética e mutações aleatórias

A evolução natural produz um grande número de proteínas e variantes de enzimas. Essas variantes naturais exibem sua função com elevada especificidade e eficiência. No entanto, elas são ajustadas para executar apenas a sua função fisiológica e, portanto, sua especificidade e estabilidade estão geralmente muito longe das necessidades da indústria biotecnológica. A evolução dirigida ou sintética é um processo de laboratório realizado *in vitro* para a geração de enzimas, proteínas, vias metabólicas ou mesmo todo um genoma com propriedades novas e desejadas a serem selecionadas. Para criar evolução *in vitro*, o processo de evolução natural deve ser acelerado de modo que a diversidade de sequência (variabilidade genética) possa ser criada e selecionada em um prazo muito mais curto (LABROU, 2010).

Os dois métodos que têm sido utilizados para evolução *in vitro* são a mutagênese aleatória e a recombinação gênica. Resumidamente, pode-se dizer que a recombinação genética refere-se à troca de blocos de sequências entre duas ou mais cadeias de DNA e a mutagênese aleatória é uma estratégia de evolução dirigida que resulta em mutações pontuais aleatórias em genes inteiros.

A mutagênese aleatória promove a diversidade com mutações pontuais, seja por meio da substituição ao acaso de um aminoácido, seja por sua inserção/eliminação, ou ainda produção de formas truncadas por inserção de códons de parada de tradução. A introdução de mutações durante o processo de replicação do DNA pode ser realizada por diversos métodos, como o emprego de agentes químicos ou físicos mutagênicos, a utilização de cepas “mutantes” ou “proteínas envolvidas na replicação de DNA mutantes”, ou, ainda, emprego de métodos baseados em mutagênese saturada (WONG et al., 2006). Outra maneira de criar diversidade molecular é através de mutações mediante a eliminação e posterior inserção de um número arbitrário de bases consecutivas em posições ao acaso (MURAKAMI et al. 2002).

Entretanto, o método ideal para realizar mutagênese aleatória de um gene de interesse, além de ser simples, reproduzível e econômico, deve ter um espectro mutacional imparcial e uma frequência de mutação controlável e independente do tamanho do gene. Os métodos mutagênicos mais amplamente utilizados por cumprir os requisitos descritos são os baseados em reações enzimáticas de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (RASILA et al., 2009).

RASILA et al., (2009) compararam as técnicas de mutagênese aleatórias mais utilizadas e a técnica de PCR propensa a erro (epPCR); a epPCR foi a que produziu as maiores taxas de mutação e a mais ampla gama de funcionamento mutacional, ao passo que os métodos químicos e biológicos geraram um nível baixo de mutações e exibiram uma estreita gama de operação. Além disso, a epPCR provou ser uma técnica mutagênica com frequências de mutação bem controláveis.

A mutagênese aleatória é uma ferramenta poderosa para a elucidação da relação entre estrutura e função e para a modificação de proteínas a fim de melhorar ou alterar suas características. PCR propensa a erros (epPCR) é uma técnica de mutagênese aleatória que gera substituições de aminoácidos em

proteínas, por meio da introdução de mutações em um gene durante a PCR realizada nos processos de clonagem. As mutações são deliberadamente introduzidas através da utilização de DNA-polimerases propensas a erro e/ou condições de reação alteradas (DAUGHERTY et al., 2000).

A epPCR baseia-se substancialmente no aumento da frequência de erro global de *Taq* DNA polimerase. Essa enzima, que carece de atividade 3'-5' exonucleásica, apresenta taxa de erro de 0,8-1,1 x 10^{-4} substituições de bases/par de base de produto, sob condição padrão de reação. O número de substituições durante a reação de epPCR pode crescer aumentando-se a concentração de Mg^{2+} relativa à concentração total de desoxirribonucleotídeo-trifosfatos (dNTPs), adicionando-se concentrações superiores a 5 mM de Mn^{2+} ou utilizando concentrações de dNTPs desbalanceadas (RASILA et al., 2009; LABROU, 2010).

A mutagênese aleatória permite aos pesquisadores identificar mutações benéficas biotecnologicamente na falta de informação estrutural, ou quando tais mutações são de difícil previsão a partir da estrutura de proteínas. Após a PCR, a biblioteca de genes mutados pode ser clonada em um plasmídeo adequado para sua expressão e análise (ZHANG et al, 2015). A evolução dirigida tem sido utilizada em diversos estudos e nas mais diferentes áreas, buscando melhorias como o aumento da produção, aumento da atividade ou para melhoria da estabilidade de uma proteína ou enzima de interesse.

Exemplos de sucesso têm sido relatados na literatura. Utilizando métodos de mutação aleatória e recombinações gênicas foram aumentados em cerca de 30 vezes os níveis de expressão da enzima P450sca -2, e em 8 mil vezes a atividade total da enzima lacase, além de melhorar em 40 vezes o nível de secreção desta última (CAMARERO et al., 2012; LI et al., 2009). Utilizando apenas mutagênese aleatória foi obtida a melhoraria da termo estabilidade enzimática da DCase-M3 de *Ralstonia pickettii* (enzima utilizada industrialmente na produção de D-aminoácidos opticamente ativos, os quais são amplamente utilizados como intermediários na síntese de pesticidas, antibióticos, peptídeos e hormônios) (YU et al. et al., 2009). ANSORGE-SCHUMACHER et al., (2006), utilizando apenas dois *rounds* de epPCR conseguiram variantes de desidrogenase de *Candida boidinii* com atividade residual até 4,4 vezes (440%) maior que a enzima de tipo selvagem e propriedades muito adequadas para a

aplicação em processos técnico- sintéticos, permitindo o uso de aprisionamento em gel de poliacrilamida, como um método de imobilização enzimático econômico e versátil. Mais recentemente, TAN et al., (2016) demonstraram que a tolerância ao etanol de *Zymomonas mobilis* pôde ser aumentada através da mutagênese aleatória da proteína RpoD do fator de transcrição global. O grupo conseguiu isolar quatro mutantes com tolerância elevada ao etanol a partir de bibliotecas de PCR propensa a erros.

1.6. Fatores que influenciam a produção de proteína recombinante

A produção heteróloga em *E. coli* é extensivamente utilizada para se obter grandes quantidades de uma proteína de interesse. Diversos fatores influenciam no rendimento final da proteína recombinante, incluindo as condições de cultivo, composição do meio, tipo do indutor utilizado, a duração da fase de produção e o nível de expressão (KHAN et al., 2009). Contudo, a otimização de condições de produção de proteína recombinante não é tão simples, pois estratégias comuns utilizadas para aumentar a biomassa muitas vezes levam ao acúmulo de uma grande fração de proteínas inativas (VOLONTÈ et al., 2008).

Planejamentos experimentais estatísticos têm sido utilizados por diversos pesquisadores da área de biotecnologia como uma estratégia de otimização de processo com simultânea redução do número de experimentos (EL-NAGGAR, N.E.-A. et al., 2015). O método de superfície de resposta (RSM) é rotineiramente utilizado para estudos de otimização, e é desenvolvido com base no delineamento composto central fatorial (CCD) (BEIGI et al., 2012).

A composição do meio de cultivo é considerada fator fundamental para a produção eficiente de biomoléculas e, portanto, deve ser estudada e otimizada. De acordo com SEZONOV (2007), o meio LB é muito utilizado no cultivo de bactérias recombinantes e contém menos de 100 μM de açúcares fermentáveis e utilizáveis por *E. coli* (açúcares livres, fosfatos de açúcar, oligossacarídeos, nucleotídeos etc.). Além disso, o meio LB é rico em oligopeptídeos e aminoácidos metabolizáveis.

Apesar do LB ser um meio de cultivo amplamente utilizado para cultivar culturas bacterianas, principalmente pela facilidade de preparo e por ser fonte de

uma ampla base de nutrientes, o mesmo pode ser uma escolha inadequada para estudos fisiológicos em que a reprodutibilidade é necessária (NIKAIDO, H., 2009).

Outro fator importante, quando se utiliza um micro-organismo recombinante em cultivos de larga escala, é a instabilidade do plasmídeo (ÅKESSON et al., 2001; SCHMIDT, 2005), que pode ser afetada por diversos fatores, até mesmo pelo próprio indutor da expressão. A síntese de proteínas recombinantes em *E. coli*, como a L-ASNase, começa após a adição de um indutor adequado ao promotor usado na clonagem (ÅKESSON et al., 2001) e o tempo da fase de indução tem de ser o mínimo para evitar degradação e garantir a obtenção de uma enzima de alta qualidade. O momento de início da indução é fator importante na expressão de proteínas recombinantes, uma vez que o estado fisiológico do cultivo no momento da indução pode afetar a resposta e a eficiência metabólica. Se o início do processo de indução ocorre na metade da fase logarítmica de crescimento, as células (que ainda são poucas) podem fornecer energia e precursores metabólicos para a síntese proteica. Por outro lado, se a indução começa no final da fase logarítmica ou na fase estacionária de crescimento, haverá alta concentração celular no meio, mas as células poderão estar fisiologicamente em condição desfavorável para produção de proteínas (CURLESS et al., 1990). O resultado final será específico para cada biomolécula alvo e deve ser avaliado nos bioprocessos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obtenção de uma ErA melhorada em relação às proteoformas atualmente aplicadas na terapêutica, por meio de condições otimizadas de produção, contribuindo assim para aumento do rendimento e da produtividade.

2.2. Objetivos Específicos

a) Criação de biblioteca de clones produtores de ErA

b) Avaliação do sequenciamento genético dos clones selecionados para verificar mutações.

c) Determinação da atividade específica (asparaginásica e glutaminásica) das ErAs selecionadas.

d) Avaliação da estabilidade das proteínas mediante a incubação com Catepsina B (CTSB) e Asparaginil endopeptidase (AEP).

e) Análise da influência do pH e temperatura na atividade enzimática.

f) Avaliação da termo estabilidade da enzima.

g) Estudo da influência dos meios de cultivo no crescimento celular do clone mutante em agitador metabólico.

h) Análise da influência das variáveis durante a fase de indução: concentração indutor, temperatura e tempo de indução e velocidade de agitação na produção de ErA do mutante selecionado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou superior obtidos da *Sigma-Aldrich, Merck-Millipore*, ou fornecedores indicados quando de origem diferente. O vetor de clonagem pUC57 contendo o gene *asnB* codificador de L-ASNase de *E. chrysanthemi* foi adquirido da empresa norte-americana *GenScript*, a qual realizou a síntese do gene com códons otimizados para expressão em *E. coli*.

O vetor de expressão utilizado foi o pET15b (*Novagen – Merck Millipore*), que possui 5708 pbs com três sítios de clonagem (NdeI específica para o sítio 5' CATATG 3', BamHI para a sequência 5' GGATCC 3'). A presença de origem de replicação compatível com o sistema de síntese de DNA da célula hospedeira, permite que o sistema enzimático do mesmo reconheça e multiplique esse novo DNA. Além disso, presença de marcadores genéticos como o gene de resistência à ampicilina permitindo a seleção de clones resistentes. E por fim, contém também uma região promotora e terminadora de T7 RNA polimerase para transcrição em alta eficiência.

As enzimas de restrição utilizadas na construção do vetor foram *Nde I* e *BamH I* da *New England Biolabs*. Para as clonagens foi utilizada a bactéria DH5α, enquanto que para expressão utilizou-se a linhagem de bactéria *E. coli*: BL21(DE3) [F-, amp T, hsdSb (rB- mb-), gal, dcm (DE3)] (*Novagen*).

O preparo dos meios de cultivo foi realizado de acordo com ROMANO et al., 2009, mostrado na Tabela 1:

Tabela 1: Composição dos meios de cultivo utilizados no crescimento de *E. coli* recombinante visando à produção de ErA.

Meio	Composição do meio de cultivo
LB	10g/L bacto-triptona, 5g/L extrato de levedura e 5g/L NaCl
SB	32g/L bacto-triptona, 20g/L extrato de levedura e 5g/L NaCl

SB3	44g/L bacto-triptona, 30g/L extrato de levedura e 10g/L NaCl
TB	12g/L bacto-triptona, 24g/L extrato de levedura, 8mL/L de glicerol, 17mM KH2PO4 e 72 mM K2HPO4
TB5	12g/L bacto-triptona, 24g/L extrato de levedura, 8mL/L de glicerol, 17mM KH2PO4, 72 mM K2HPO4 e 5g/L NaCl
TY	20g/L bacto-triptona, 10g/L extrato de levedura, 8mL/L de glicerol e 5g/L NaCl

3.2. Obtenção da proteína ErA Selvagem

3.2.1. Construção do vetor de expressão da ErA

A construção do vetor de expressão com o gene *asnB* otimizado foi realizada anteriormente pela aluna de iniciação científica do grupo, Mariana Silva Moreira Leite.

No vetor pET15b, a presença de origem de replicação compatível com o sistema de síntese de DNA da célula hospedeira, permite que o sistema enzimático da mesma reconheça e multiplique esse novo DNA. Além disso, presença de marcadores genéticos como o gene de resistência à ampicilina permite a seleção de clones transformantes. E por fim, esse vetor de expressão contém também uma região promotora e terminadora de *T7* RNA polimerase para transcrição em alta eficiência (NESTEROVA et al., 2001).

A construção (*asnB* + pET15b) foi transformada nas cepas de *E. coli DH5α,* ideal para a manutenção do plasmídeo, e *BL21(DE3)*, ideal para expressão proteica (NOVAGEN, 2006). Também foi realizada uma construção em que o vetor de expressão sem o gene de interesse (pET15b vazio) foi transformado em *E. coli BL21(DE3).* Em todos os casos, as cepas depois de transformadas foram criopreservadas em glicerol 10%, a temperatura de -80°C.

3.3. Produção da biblioteca de clones mutados randomicamente

Diversas metodologias foram utilizadas para a obtenção da biblioteca de clones mutantes da ErA. O esquema experimental está indicado na Figura 1 e as metodologias estão descritas nos subitens dessa seção:

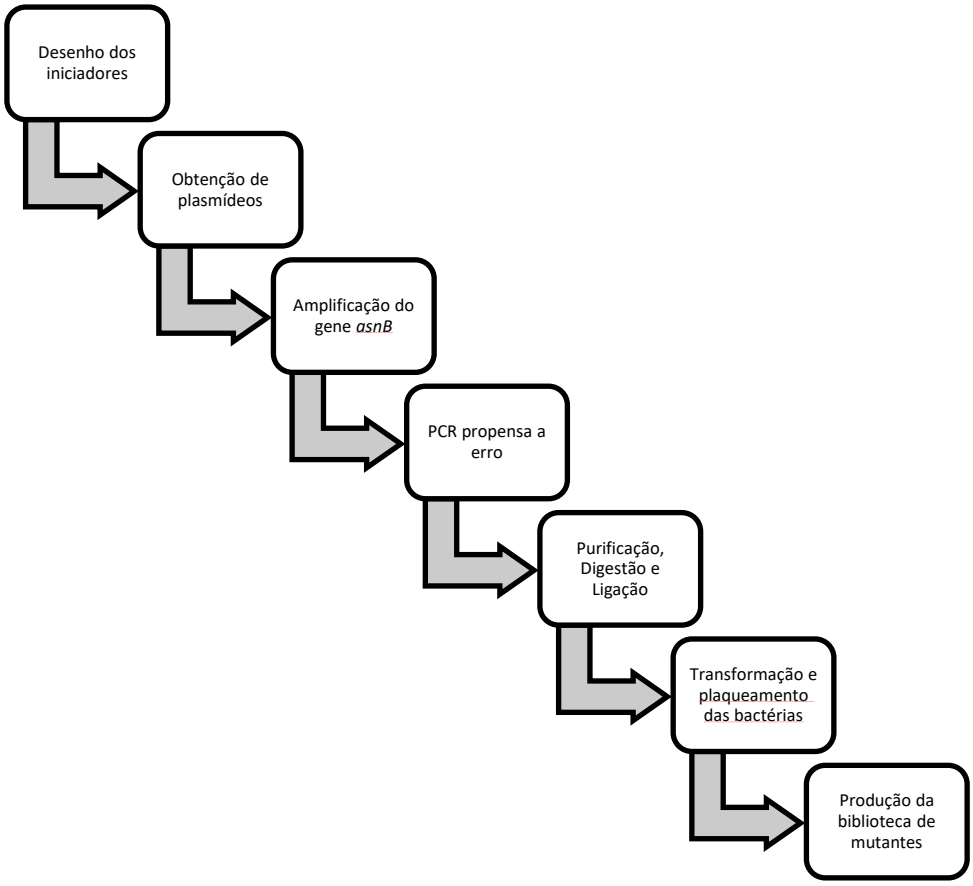


Figura 1. Esquema dos passos metodológicos seguidos para a produção da biblioteca de mutantes.

3.3.1. Desenho de iniciadores

Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa CLC *Sequence Viewer*, em que se verificou a possível existência de sítios de clivagem para as enzimas de restrição escolhidas no interior da sequência do *asnB*.

A escolha das enzimas de restrição e do tampão adequado se fez a partir da consulta do *site* da New England Biolabs, e as enzimas escolhidas foram *NdeI*

(adaptador no iniciador direto) e *BamHI HF* (adaptador no iniciador reverso) e o tampão "*CutSmart ® buffer*".

A determinação do tamanho dos iniciadores e da temperatura de anelamento foi realizada com o auxílio do *site* da Integrated DNA Technology, através do programa OligoAnalyzer 3.1 (https://www.idtdna.com/calc/analyzer) . Os iniciadores foram adquiridos da empresa Exxtend, e as sequências nucleotídicas estão indicadas abaixo:

Asp2E.chrysanthemifw: 5' GGG AAT TC C ATA TG G AAC GCT G 3'
Asp2E.chrysanthemirev: 5' CGC GGA TCC TCA AGT AAG G 3'

Os iniciadores vieram liofilizados e foram diluídos com tampão Tris-EDTA (TE: 10mM Tris; 0.1 mM EDTA; pH 8.0) para uma concentração de 1 nmol/µl, e foi denominada de solução iniciador estoque.

Uma nova diluição foi feita de forma que a concentração final dessa solução fosse de 15 pmol/µl, a qual foi chamada de solução trabalho.

3.3.2. Obtenção do plasmídeo pET15b+asnB

As cepas de *E. coli* DH5α (asnB + pET15b) foram inoculadas em 4 mL de L.B. com 0,1mM de carbenicilina e incubados a 37 °C, 180 rpm por 16 horas.

Após o crescimento das células, foi realizada a extração plasmidial através do kit comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit*, de acordo com as instruções do fabricante. O princípio desse kit é baseado em um procedimento de lise alcalina modificada, seguida da ligação do DNA plasmidial à resina QIAGEN sob condições apropriadas de baixa salinidade e pH específico (QIAGEN, 2012).

O plasmídeo eluído foi utilizado como molde para as amplificações por PCR (reação em Cadeia da Polimerase), descrito em 3.3.3., bem como na transformação da linhagem de expressão BL21(DE3), servindo de controle positivo para atividade ótima de ErA.

3.3.3. Amplificação de asnB para molde da epPCR

A amplificação do *asnB* foi realizada de acordo com seguinte protocolo (VF = 50 µL): iniciador *forward* T7 (0,3 µM); iniciador *reverse* T7 (0,3 µM); 46 µL *Platinum® PCR Supermix* (Invitrogen™) e 1 ng/µL de molde derivado da extração plasmidial do pET15b+*asnB* (item 3.3.2). O Termociclador utilizado foi o Veriti™ da *Applied Biosystems*® com o seguinte ciclo: 1x a 94 °C por 2 minutos; 30x a 94 °C por 30 segundos (s), 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 minuto; 1x a 72 °C por 7 minutos e ∞ a 4 ° C. O tamanho esperado resultante dessa amplificação é de 1035 pbs.

O resultado da amplificação de DNA foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1x (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 0,05 mM, pH 8,0) com 0,1 µM de brometo de etídeo, o qual possibilita a visualização do DNA em luz UV, usando fotodocumentador *Major Science UV DI*.

3.3.4. Mutagênese randômica por PCR propensa a erros (epPCR)

A biblioteca de clones foi obtida com a utilização do kit da Agilent *GeneMorph® Random Mutagenesis*, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante (VF = 50 µL): 2,5 ng/µL de iniciador *forward* específico (Asp2E.chrysanthemifw 125 ng/µL); 2,5 ng/µL iniciador *reverse* específico (Asp2E.chrysanthemiScrev 125 ng/µL); 1 µL de 10x *Mutazyme II reaction buffer*, 40 mM dNTP mix, 1 µL de *Mutazyme II DNA polymerase* e 1 ng/µL de molde (50 ng/µL) derivado da PCR descrita acima (item 3.3.3). A reação da epPCR ocorreu com o seguinte ciclo: 1x a 95 °C por 2 minutos; 25x a 95 °C por 30 segundos (s), 63 °C por 30 s e 72 °C por 30 s; 1x a 72 °C por 10 minutos e ∞ a 4 °C. De acordo com os parâmetros utilizados na reação executada e a partir da análise da Tabela 2, adaptada dos dados do fabricante, a taxa de mutação prevista para os possíveis clones mutantes da biblioteca era de média à alta.

Tabela 2. Tabela adaptada representando a taxa de mutações previstas utilizando o kit *GeneMorph® Random Mutagenesis*

Frequência de mutações vs. Quantidade inicial de molde			
Taxa de mutação	Frequência de mutação (mutações /kb)	Quantidade de material para a amplificação (ng)	Número de amplificações
Baixa	0 - 4,5	500-1000	1,5-10
Média	4,5 - 9	100-500	10-100
Alta	9 - 16	0,1-100	100-10000

O produto da reação da epPCR foi purificado através do *kit GFX PCR DNA* da GE *Healthcare*, de acordo com as instruções do fabricante. A verificação da purificação foi feita através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, como descrito previamente em 3.3.3.

3.3.5. Digestão e ligação

A reação de digestão dos DNAs foi realizada com as enzimas *Bam HI* e *Nde I*, com tampão *CutSmart®*, de acordo com as instruções do fabricante *New England Biolabs*. Para a digestão do vetor pET15b, utilizou-se 250 ng do vetor com 9,1 µL de tampão *CutSmart®*, 1,2 U de *Bam HI H.F.*, 2,0 U de *Nde I*, totalizando 75 µL de reação por 16 horas a 37 °C. Para a digestão do produto de PCR propensa a erro purificado foram digeridos 150 ng por 16 horas a 37 °C com 9,1 µL de tampão *CutSmart®*, 1,2 U de *BamHI H.F.*, 2,0 U de *NdeI*, totalizando 75 µL de reação (NEW ENGLAND BIOLABS, 2014)

Terminada a digestão, fez-se a purificação dos DNAs após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, seguindo as instruções do fabricante do kit *GFX PCR DNA* da GE Healthcare. A quantificação de material genético foi realizada através da comparação da intensidade de bandas com padrão comercial *Low mass DNA ladder* em gel de agarose, uma vez que é necessária a concentração para calcularmos as quantidades de DNA necessários para a reação de ligação. Foram obtidas as concentrações de 50 ng/µl para o inserto e 20 ng/µl para o vetor.

A reação de ligação foi realizada de acordo com o protocolo da enzima T4 DNA Ligase (PROMEGA, 2016). Foram utilizados 12,5 ng do vetor pET15b

digerido, 60 ng dos insertos previamente digeridos, 2 µL Ligase Buffer 1x e 0,3 U/µL de T4 DNA ligase totalizando em 15 µL de reação. Essa reação foi incubada a 16 °C por 16 horas.

3.3.6. Transformação e plaqueamento.

Após a reação de ligação, foi feita a transformação em *E. coli* BL21 (DE3) competente. Da reação de ligação, 1,2 µL foram adicionadas a um tubo eppendorf contendo 40 µL de *E. coli* BL21 (DE3) eletrocompetente, sendo que essa mistura foi inserida na cubeta para eletroporação. A eletroporação ocorreu a 2,5 kV (equipamento BioRad®. Gene Pulser II). Em seguida, foi adicionado 1 mL de L.B. na cubeta para a ressuspensão das células bacterianas, as quais foram incubadas por 1 hora a 37 °C sob agitação de 180 rpm.

Após esse período, 100 µL da transformação foram plaqueadas em meio sólido L.B. contendo 0,1 mM de carbenicilina. Fez-se 13 placas derivadas da mesma transformação, as quais ficaram incubadas a 37 ºC por um período de 16 horas para o crescimento de colônias.

3.3.7. Construção da biblioteca de clones mutantes

Para a construção da biblioteca de mutantes, foram utilizados três controles: positivo, negativo e vazio. O controle positivo foi definido como a construção *asnB* + pET15b; o controle negativo como a construção pET15b vazio, ambas transformadas em *E. coli BL21(DE3).* E por fim, o controle denominado vazio, no qual não foi inoculado nenhum micro-organismo.

De cada uma das 13 placas preparadas no item 3.3.6, selecionou-se 88 colônias pequenas e isoladas para a criação da biblioteca de mutantes. Utilizou-se 13 placas de 96 poços de volume 1 mL por poço para o crescimento de cada colônia. Colocou-se 400 µL de meio líquido L.B. com carbenicilina em cada poço e inocularam-se os mutantes e os micro-organismos de controle na placa conforme indicado na Figura 2:

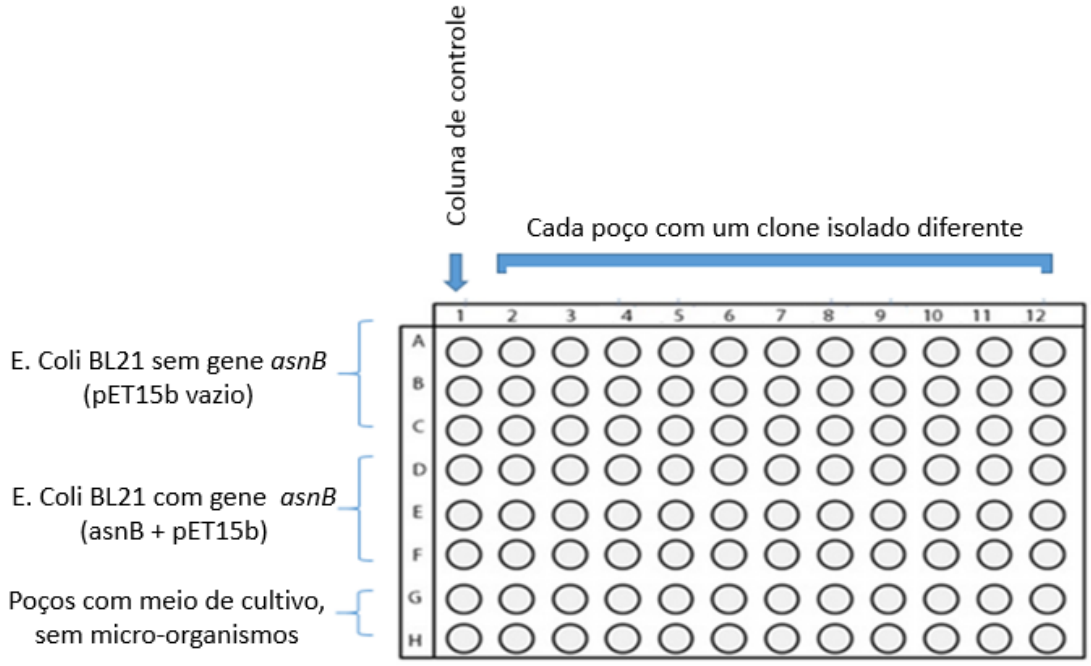


Figura 2. Esquema da conformação das placas para a criação da biblioteca de mutantes. Os controles foram inoculados na coluna 1: das linhas A, B e C - negativos, das linhas D, E e F- os controles positivos. Ainda na coluna 1 das linhas G e H, foi inserido apenas meio de cultura LB com 0,1 mM de carbenicilina para a verificação de possíveis contaminações cruzadas devido à agitação da placa.

Após o inóculo, cada placa foi incubada em agitador metabólico a 37 ºC, sob agitação de 180 rpm, por 16 horas. Após o crescimento, as células foram criopreservadas na própria placa e armazenadas a -80 ºC.

3.4. Seleção dos mutantes

A seleção dos clones mutantes foi realizada de acordo com os procedimentos descritos abaixo e estão esquematizados na Figura 3:

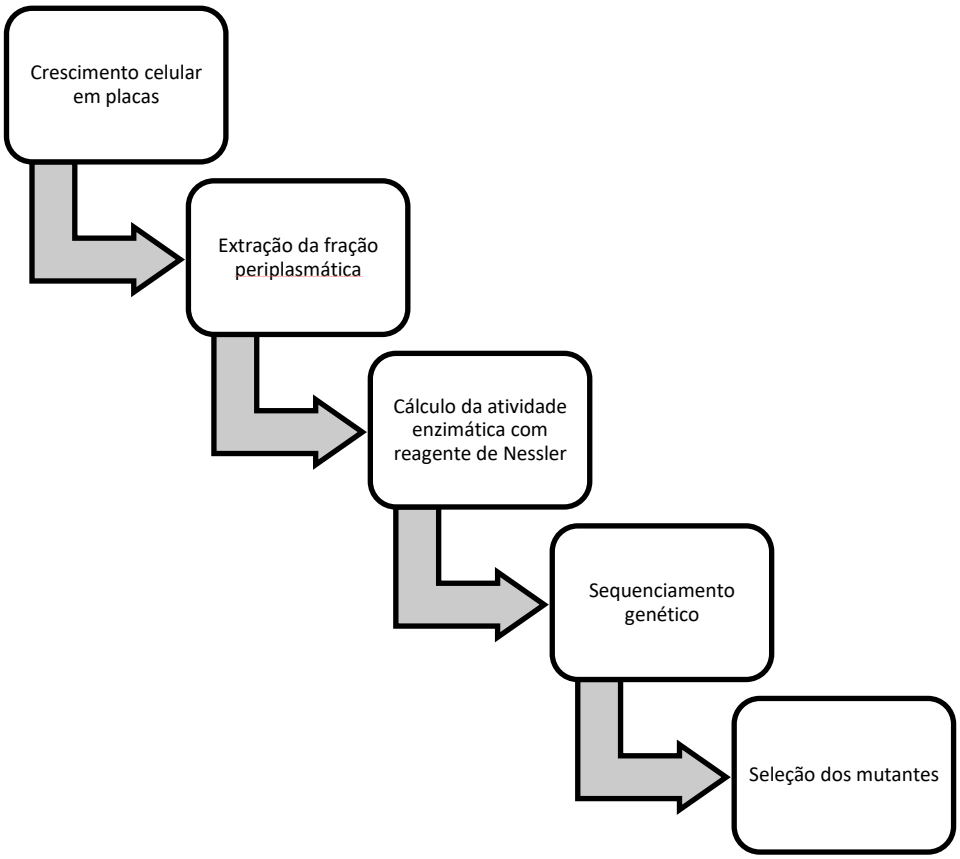


Figura 3. Esquema da sequência metodológica para a confirmação e seleção dos mutantes obtidos produzidos por epPCR.

3.4.1. Crescimento celular em placas

O crescimento dos clones foi realizado em placas com 96 poços de 1mL. Em cada poço com 400 µl de LB contendo 0,1 mM de carbenicilina foi inoculado um clone derivado das placas criopreservadas. O procedimento foi realizado com a utilização de um replicador metálico, o qual permite que cada haste entre em contato com o micro-organismo correspondente de um único poço de cada placa. As placas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 18 horas.

Após esse período, foram retirados 100 µL de cada poço para leitura de densidade ótica (OD) a 600 nm em espectrofotômetro de placas (Spectra Max M2 – *Molecular Devices*). A partir dos valores obtidos, calculou-se o volume necessário de meio L.B. com 0,1 mM de carbenicilina que deveria ser adicionado para que o valor de OD_{600nm} estivesse a 0,2 (em média) por poço. As placas

foram incubadas a 37 °C, 200 rpm de agitação por 2 horas, e em seguida realizou-se nova medida de OD. Quando o valor de 0,6 (em média) foi alcançado, adicionou-se 1 mM do indutor isopropril-β-D-1-tiogalactopiranosideo (IPTG), e as placas foram mantidas por 16 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm.

Posteriormente, as células foram centrifugadas (4000 x *g*, 30 minutos 4°C), o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram congelados a -20 °C, para posterior extração das proteínas periplasmáticas por choque osmótico (descrito no item 3.4.2).

3.4.2. Choque osmótico

A liberação do conteúdo periplasmático consiste em lisar apenas a parede celular. O procedimento de choque osmótico utilizado foi adaptado de HARMS et al. (1991). Para isso, os *pellets* obtidos e armazenados nas placas foram ressuspendidos em uma solução gelada denominada "*Spheroblast buffer*" (Tris-HCl 0,1 M pH 8,8; EDTA 0,5 mM e 0,5 M de sacarose). A quantidade utilizada desse tampão por poço foi de 100 µL, e em seguida as placas foram mantidas por 5 minutos em gelo. Após esse tempo, o conteúdo foi centrifugado por 30 minutos, 4.000 x *g* a 4 ºC.

O sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante foi ressuspendido com 45 µL de uma solução gelada de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 0,25 mM e mantida por 5 minutos no gelo. Após esse tempo, esse conteúdo foi centrifugado por 30 minutos, 4.000 x *g* a 4 ºC. O sobrenadante resultante da centrifugação corresponde à fração periplasmática, imediatamente analisada quanto à atividade.

3.4.3. Determinação da atividade enzimática com reagente de Nessler

A determinação da atividade enzimática extraída da fração periplasmática foi realizada utilizando o Reagente de Nessler ($K_2[HgI_4]$) para detectar a formação de amônia durante a reação catalisada pela L-ASNase (ou glutaminase), seguindo a metodologia SIGMA-ALDRICH (1997). O resultado

dessa reação gera um composto de coloração amarelada, cuja leitura da absorbância pode ser realizada em espectrofotômetro a 440nm.

O ensaio de atividade específica foi realizado em microplacas utilizando 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 44 mM de L-asparagina (para atividade asparaginásica) ou 44 mM de L-glutamina (para atividade glutaminásica) e 17 µL da fração periplasmática (bem como diluições 1:2, 1:5 e 1:10 dessa fração). A reação (370 µL) foi incubada a 37 °C por 12 minutos e interrompida com 2,4 µM de ácido tricloroacético - TCA (IMADA et al., 1973; PRADHAN et al., 2013).

Uma unidade é dada como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de amônia por minuto a 37 °C, sob condição de saturação do substrato (KOTZIA e LABROU 2007; MEHTA et al. 2014). A concentração de amônia foi calculada a partir da interpolação dos valores de absorbância obtidos após a reação em curvas de calibração da concentração de amônia, utilizando as equações 1 e 2 para o cálculo da atividade asparaginásica e glutaminásica, respectivamente:

Absorbância = 6,2123.[amônia] + 0,0122; r^2=0,9951 (Equação 1)

Absorbância = 7,2337.[amônia] – 0,2301; r^2=0,9974 (Equação 2)

As equações 1 e 2 foram obtidas de modo experimental por meio de leituras de absorbância de concentrações conhecidas de sulfato de amônio incubadas com o reagente de Nessler nas mesmas condições experimentais do ensaio enzimático.

3.4.4. Reação de sequenciamento

Os clones que apresentaram pelo menos 80% da atividade da enzima selvagem foram submetidos ao sequenciamento genético para a verificação das mutações resultantes. A reação de sequenciamento foi realizada seguindo o protocolo do Serviço de Sequenciamento de DNA do Instituto de Química – IQ/USP (SSDNA). Para reação de sequenciamento foi utilizado: 100 ng/µL de DNA molde resultado da extração dos plasmídeos, 0,64 pmol/µL de primer T7

FW ou RV, 3 µL de *sequencing buffer* 5X, 2 µL de *BigDye v.3,1*, volume final de 15 µL.

A reação consistiu em uma fase inicial de desnaturação a 96 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 45 segundos, anelamento a 53 °C por 30 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos e mais um estágio a 60 °C por 4 minutos.

A precipitação do DNA resultante da reação descrita acima foi feita adicionando-se aos 15 µL da reação de sequenciamento 25 µL do "coquetel de precipitação" (92,6% de etanol, 111 mM de NaOAc pH 5,2, 37 µg/mL de glicogênio), misturado e mantido no gelo por 15 minutos. Posteriormente, a reação foi centrifugada a 4.000 x *g* por 20 minutos a temperatura ambiente, e os microtubos foram invertidos para descartar o excesso de solução através de um pulso de centrifugação a 1.000 x *g.* Foi adicionado à reação 50 µL de etanol 70% gelado, e repetiu-se a centrifugação por 10 minutos e a inversão dos microtubos. As reações foram colocadas no termociclador por 1 minuto a 95 °C, para secagens finais do etanol, e enviadas ao SSDNA (IQ-USP).

3.4.5. Análise do sequenciamento

Os sequenciamentos genéticos foram analisados com o auxílio dos programas Chromas e GeneRunner. As mutações foram analisadas com objetivo de identificar aquelas que resultaram na alteração de algum aminoácido da sequência proteica.

3.4.6. Seleção dos mutantes

A seleção dos mutantes foi baseada em dois critérios: no valor da atividade calculada da fração periplasmática da enzima produzida e que essa enzima possuísse pelo menos uma mutação da sequência de aminoácidos.

O valor mínimo usado para seleção foi que a enzima apresentasse pelo menos 80% da atividade da enzima selvagem. As mutações silenciosas foram

descartadas. Apenas os clones que apresentaram enzimas produzidas com mutação em pelo menos um aminoácido foram selecionados.

3.5. Seleção da enzima mais promissora

A seleção das enzimas mais promissoras foi feita de acordo com esquema metodológico demonstrado na Figura 4:

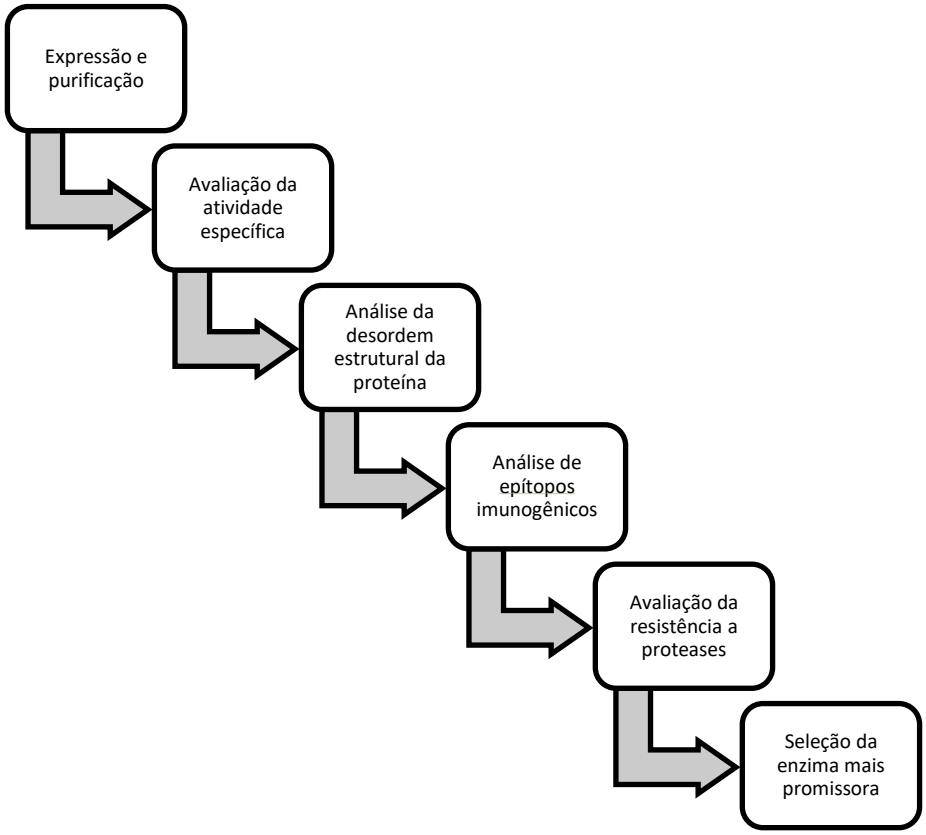


Figura 4. Esquema das metodologias utilizadas para a seleção da enzima mais promissora.

3.5.1. Expressão e purificação das proteínas selecionadas

Os clones selecionados foram inoculados em 100 mL de L.B. em *erlenmeyer* de 250 mL, com 0,1 mM de carbenicilina por 16 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. As células foram diluídas para OD_{600nm}= 0,2 em 1 L de meio fresco L.B. em *erlenmeyer* de 2L, com 0,1 mM de carbenicilina e crescidas

até OD_{600nm} entre 0,6 a 0,8. Após atingir a OD esperada adicionou-se 1 mM de IPTG, por 3 horas 37 °C sob agitação de 180 rpm.

Após o período da expressão, as células foram centrifugadas a 3.000 x *g* por 30 minutos. O *pellet* foi ressuspendido com 50 mL de tampão Fosfato de potássio 20 mM pH 5,8, com 0,1 mM EDTA e 0,1 mM PMSF, mantidos em gelo e sonicado com equipamento Branson, 60Hz. Foram realizados 12 ciclos de 15 segundos com intervalos de 45 segundos e amplitude de 30%. O lisado celular foi centrifugado a 16.000 x *g* por 20 minutos, o sobrenadante coletado e filtrado em membrana de 0,45 µm (Millipore).

A purificação foi realizada em 2 etapas, com método adaptado de KOTZIA e LABROU (2007), no equipamento FPLC (*fast protein liquid chromatography*) AKTA Purifier (*GE Life Sciences*): o sobrenadante foi aplicado em coluna de troca catiônica HiTrap SP FF 5 mL (*GE Life Sciences*) com fluxo de 4 mL/min, previamente equilibrada com fosfato de potássio 20 mM pH 5,8 e lavada com 50 mL do mesmo tampão. A proteína foi eluída com tampão Fosfato de potássio 20 mM pH 7,5. Foi realizado um segundo passo de purificação por exclusão molecular, no qual a proteína obtida da troca catiônica foi concentrada e 1,0 mL dessa solução proteica foi aplicada em coluna *Superdex 200 Increase 10/300 GL* (*GE Life Sciences*), com fluxo de 0,75 mL/min, previamente equilibrada com tampão Fosfato de potássio 20 mM pH 7,5, 0,15 M NaCl e 0,1 M glicina. A verificação do ponto isoelétrico (pI) das proteínas obtidas foi realizada pelo portal *Expasy* (https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool).

A confirmação da purificação e a verificação do tamanho da proteína foram feitas através de eletroforese em gel SDS-PAGE (item 3.5.2).

3.5.2. Gel SDS-PAGE

O gel de separação foi preparado utilizando 470 mM Tris-HCl pH 8,8; 14% de acrilamida/bis-acrilamida; 0,1% de persulfato de amônio (PSA); 10 µL de Temed. O gel empacotador foi preparado utilizando-se 120 mM de tampão Tris-HCl pH 6,8; 4,5% de acrilamida/bis-acrilamida; 2,3mL de H_2O; 0,1% de PSA; 10 µL de Temed.

De cada uma das amostras foi utilizado 10 µL, as quais foram mantidas a 95 °C por 5 minutos com 4 µL de tampão (60 mM de Tris-HCl pH 6,8; 25% de glicerol; 2% de SDS; 0,5 mL de β-mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol; 0,9 mL de H_2O milli-Q), 0,5 µL de DTT 1 M e 5,5 µL de água milli-Q.

As amostras e o padrão de massa molecular *BenchMark* (Invitrogen) foram aplicados no gel e a corrida eletroforética foi realizada a 150V com tampão Tris-Glicina 1X. Em seguida, o gel foi corado com *Coomassie Blue G-250* sob leve agitação por 20 minutos e descorado com solução descorante (10% de metanol; 10% de ácido acético glacial; 80% de H_2O milli-Q) sob leve agitação por 16 horas, temperatura ambiente.

3.5.3. Determinação da atividade específica

A reação para determinação da atividade específica asparaginásica e glutaminásica foi realizada conforme descrito no item 3.4.3. Concentrações diferentes de enzima (20nM a 200nM) foram hidrolisadas com 44 mM de L-asparagina como substrato para a determinação da atividade asparaginásica ou 44 mM de L-glutamina para a determinação da atividade glutaminásica.

A concentração das proteínas foi determinada por medição de absorbância a 280nm, utilizando coeficiente de extinção (19.370 $M^{-1}cm^{-1}$) obtido com o auxílio da ferramenta bioinformática ProtParam (http://web.expasy.org/protparam), de acordo com a Lei de Lambert Beer I.

A quantificação da atividade em µmol de amônio foi realizada com a interpolação de valores de absorbância com uma curva de calibração feita com concentrações conhecidas de sulfato de amônio (Equações 1 e 2). Todos os ensaios foram feitos em triplicata e a atividade específica é dada em U/mg de proteína, onde U = 1 µmol de amônio / minuto.

3.5.4. Verificação de regiões desordenadas

A comparação das regiões desordenadas da enzima selvagem e das proteoformas mutantes foi realizada com a utilização do software *Predictor of*

Natural Disordered Regions (PONDR) (http://www.pondr.com). As sequências foram inseridas no site PONDR e as regiões com pontuações maiores que 0,5 foram consideradas como regiões desordenadas. Dentre as opções, os preditores utilizados foram PONDR® VLXT, que possui alta sensibilidade às peculiaridades da sequência (ROMERO et al., 2001; POLANCO et al., 2016) e PONDR® VSL2, que é uma das opções mais precisas de predição (FAN & KURGAN, 2014; PENG et al., 2005; PENG & KURGAN, 2012).

3.5.5. Análise de epítopos imunogênicos

As análises e comparações de epítopos imunogênicos das enzimas selvagem e mutantes foram realizadas através da submissão das sequências no *site* do IEDB (www.tools.immuneepitope.org). Os métodos utilizados para as análises foram: *Karplus e Schulz flexibility scale, Emini surface accessibility scale, Parker Hydrophilicity prediction* e *Chou and Fasman beta turn prediction.*

3.5.6. Determinação da estabilidade enzimática frente às proteases sanguíneas.

As enzimas recombinantes mutadas selecionadas foram incubadas com Catepsina B (CTSB) e Asparaginil endopeptidase (AEP) (ambas ABCAM) em ensaios distintos, com tampão Fosfato de potássio 20 mM pH 7,5, e mantidas à temperatura de 37 °C por 24 horas para análise da ocorrência da degradação proteolítica (PATEL et al., 2009). Foram utilizadas 4 µg de cada enzima recombinante purificada e 2 µg de cada protease. Dois controles foram utilizados: a enzima ErA mantida a 5 ºC ou 37 ºC, ambos ensaios sem proteases. A análise qualitativa dessa degradação foi realizada pelo padrão eletroforético em SDS – PAGE corado com *Coomassie Blue G-250* (item 3.4.3).

3.5.7. Seleção da enzima mais promissora

A seleção das enzimas mais promissoras foi feita baseada em um conjunto de características e fatores: avaliação atividade asparaginásica e

glutaminásica, análise da desordem estrutural e dos epítopos imunogênicos e da resistência ou não a ação das proteases AEP e CTSB.

3.6. Caracterização da enzima selecionada

A enzima selecionada foi caracterizada por meio dos métodos esquematizados na Figura 5 e descritos abaixo:

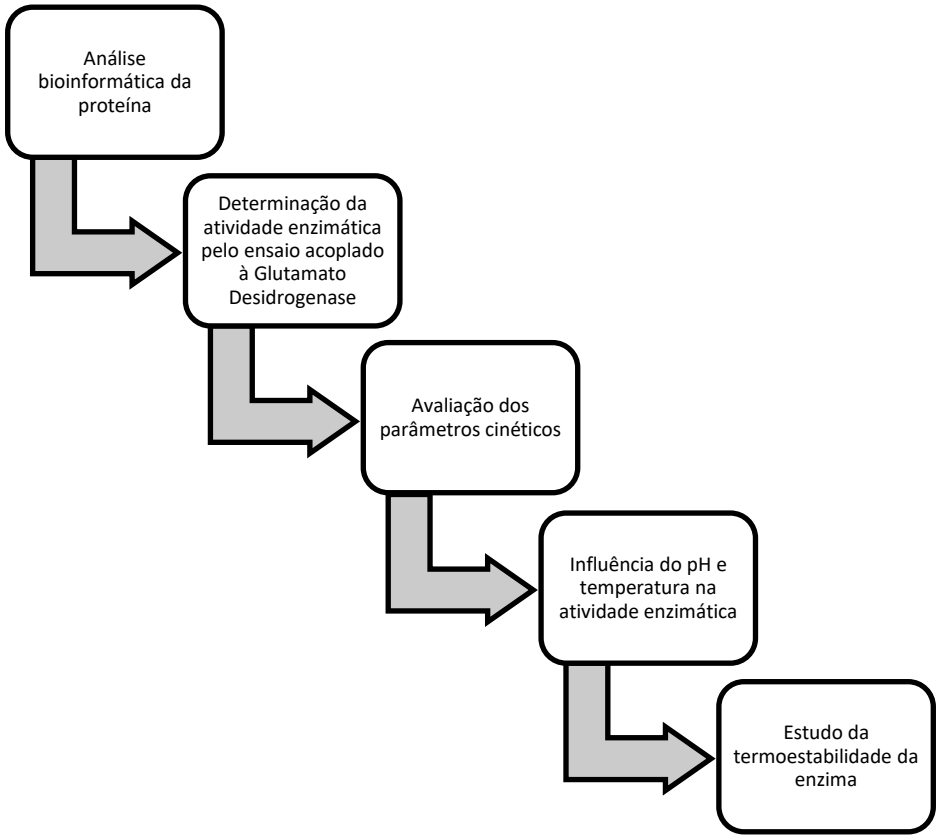


Figura 5. Desenho dos procedimentos experimentais para a caracterização da enzima recombinante selecionada.

3.6.1. Análise bioinformática da proteína

A análise bioinformática foi feita a partir da visualização tridimensional da proteína, dos sítios-ativos e das mutações foi realizada através da criação de figuras por meio do programa Pymol® Education, a partir da estrutura 1O7J publicada no Protein Data Bank (PDB). Foram utilizadas as seções

correspondentes para criação de estruturas tridimensionais em formato “cartoon”’ e “surface”.

Os principais aspectos analisados foram a localização do resíduo mutado, o domínio (N ou C-terminal), a proximidade ao sítio ativo e se a mutação ocorreu na parte interna ou externa com relação à superfície da molécula tetramérica.

3.6.2. Determinação da atividade enzimática pelo ensaio acoplado à Glutamato Desidrogenase

No ensaio acoplado à glutamato desidrogenase mede-se a oxidação do NADH pela glutamato desidrogenase (GDH). Essa oxidação produz uma molécula de L-glutamato a partir de uma molécula de α-cetoglutarato e uma de amônio, essa última provinda da hidrólise da L-asparagina ou L-glutamina pela L-ASNase (BALCÃO et al., 2001).

Os ensaios foram realizados em triplicata, com protocolo adaptado de BALCÃO et al., 2011 e COSTA et al., 2016. A reação foi feita com a utilização de 400 mU de GDH de soro bovino (diluída em 50 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,4 e glicerol 50%), 1 mM de α-cetoglutarato, 0,13 mM de NADH, substrato (asparagina ou glutamina) e enzima ErA em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,8. Para a determinação da atividade específica asparaginásica, foi utilizada 44 mM de asparagina e enzima ErA variando de 20nM a 80nM. Já para a determinação da atividade específica glutaminásica, foi utilizada 44 mM de glutamina e enzima ErA variando de 100nM a 220nM. O consumo do NADH foi monitorado pela leitura da absorbância a λ=340 nm em espectrofotômetro (Spectra Max M2 – *Molecular Devices*), a 37°C e usando o coeficiente de extinção determinado experimentalmente por BALCÃO et al. (2011), de 0,78 $\mu mol.cm^{-1}$.

3.6.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada por meio do ensaio acoplado à glutamato desidrogenase (descrito em 3.6.2). A cinética

asparaginásica foi realizada com a utilização de 20nM de enzima e L-asparagina variando de 0,043 mM a 2,75 mM, enquanto que a cinética glutaminásica foi realizada com 40nM de enzima e L-glutamina variando de 0,043 mM a 11 mM.

A partir dos dados experimentais foram realizadas análises de adequação aos modelos matemáticos de Michaelis-Menten como hipótese nula ($p<0,005$), com o software GraphPad Prisma 5.

3.6.4. Determinação da temperatura e do pH ótimos na atividade enzimática

A temperatura e o pH ideal das enzimas foram determinados pela atividade específica asparaginásica e glutaminásica, realizada com reagente de Nessler (descrito em 3.4.3), alterando os parâmetros que foram testados.

Para a determinação da temperatura ideal, a reação foi incubada a diferentes temperaturas, de 17 ºC a 67 ºC. Já para a determinação do pH, foram utilizados diferentes tampões: acetato pH 4,0; fosfato de potássio pH 5,8, 6,8 e 7,8; fosfato de sódio pH 7,4 e 11,8; Tris- HCl pH 8,8; carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,8 e 10,8.

3.6.5. Estudo da termo estabilidade da enzima

O estudo da termo estabilidade da enzima foi realizado para avaliar duas condições de estabilidade da enzima: quando mantida a baixas temperaturas e quando exposta por 45 min a diferentes temperaturas.

O primeiro ponto avaliado foi o decaimento da atividade específica de acordo com o tempo, em que a enzima foi armazenada em geladeira (2 °C a 8 ºC) e no freezer (-20 ºC).

O segundo ponto avaliado foi o decaimento percentual da atividade especifica após a incubação da enzima por 45 minutos, em ausência de substrato ou osmólitos, em temperaturas de 7°C a 57 °C (com variação de 10 °C). Após os períodos mencionados, mediu-se a atividade específica enzimática, com reagente de Nessler conforme descrito em 3.4.3.

3.7. Otimização de parâmetros de cultivo em agitador metabólico

A enzima mutante 9-5F selecionada foi otimizada de acordo com o desenho experimental apresentado na Figura 6. A condição padrão de estudo usada como comparativo foi crescimento em LB do controle positivo, definido como a construção *asnB* + pET15b transformada em *E. coli BL21(DE3)*. O crescimento foi realizado em frascos *Erlenmeyer* de 2 L contendo 1 L de meio, com 0,1 mM de carbenicilina. Decorridas 1,5 horas após inoculação das cepas, iniciou-se indução da expressão do gene com adição de 1 mM de IPTG, durante 3 horas a 37 ºC, com agitação de 180rpm.

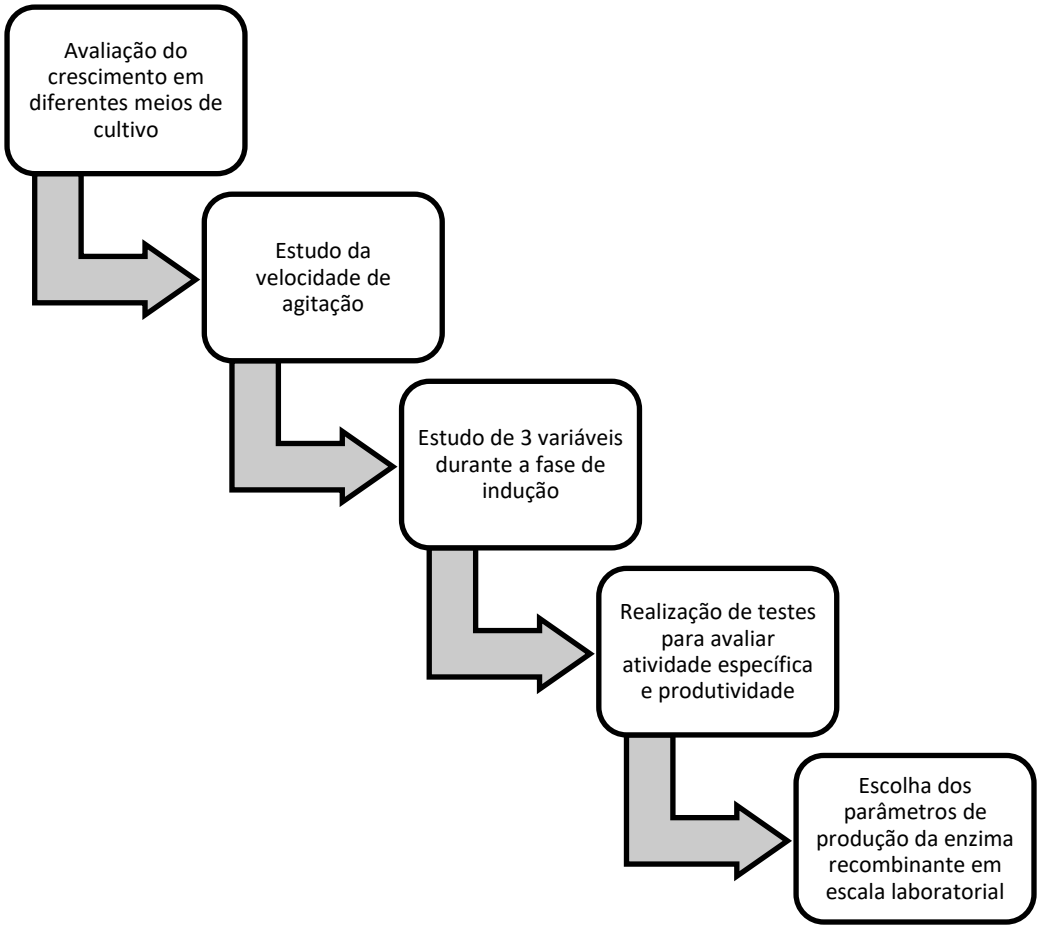


Figura 6. Desenho dos procedimentos experimentais para a otimização de parâmetros para a produção de enzima recombinante.

3.7.1. Avaliação do crescimento celular em diferentes meios de cultivo

Após a seleção da enzima mutante mais promissora, foi avaliado o crescimento celular em 6 diferentes meios de cultivo: LB, SB, SB3, TB, TB5 e TY (ROMANO et al., 2009), cujas composições estão descritas na Tabela 1. As células estoque do mutante selecionado, também transformada em *E. coli BL21(DE3)*, foram inoculadas em *Erlenmeyer* de 250 mL, contendo 100 mL de cada um dos meios descritos anteriormente, com 0,1 mM de carbenicilina e cultivadas por 16 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Após este período de cultivo, as células foram separadas do sobrenadante por centrifugação (3500 x *g*), adicionadas em *Erlenmeyer* de 2 L, contendo 1 L do meio selecionado de modo a obter uma suspensão com OD_{600nm}= 0,1, momento este em que se considerou como tempo zero (to) dos cultivos. O crescimento foi conduzido por 10 horas, a 37 °C sob agitação de 180 rpm, com leitura da Densidade Ótica até a 12ª hora.

Para o cálculo de biomassa (X) (g/L), foi construída uma curva de correlação entre valores de OD_{600nm} e massa seca, obtidos pelo método da secagem em membrana. A curva de correlação foi obtida experimentalmente, com a utilização de 5 mL de cultivo, em 5 diferentes concentrações com os valores de OD_{600nm} obtidos. Por regressão linear obteve-se a equação 3:

Absorbância = 0,931. [Biomassa] + 0,09; r^2 = 0,9912 (Equação 3)

3.7.2. Estudo da velocidade de agitação

Após a determinação do meio em que a otimização de expressão seria realizada, iniciou-se o estudo dos parâmetros para verificação da melhor condição de cultivo visando à produção de ErA.

Para o estudo do parâmetro velocidade de agitação, o crescimento e a indução foram realizados como descrito anteriormente em *3.5.1* com exceção da velocidade de agitação, em que foram testadas as velocidades de 150 rpm e 250 rpm. Após o período de expressão (3 horas), as células foram centrifugadas a 3.000 x *g* por 30 minutos e congeladas.

3.7.3. *Estudo de variáveis na fase de indução*

A indução foi realizada no final da fase log, obtida experimentalmente a partir da curva de crescimento correspondente ao meio de cultivo selecionado.

Os parâmetros avaliados na fase de indução foram: concentração de indutor, temperatura e tempo de indução. O crescimento das células até a fase de indução ocorreu como descrito em *3.5.1,* e a partir do momento da adição do indutor IPTG, foram testadas 12 condições, numeradas de 1 a 12, conforme tabela 3.

Tabela 3. Condições para otimização da fase de indução durante o crescimento do mutante selecionado.

	Condição											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentração de IPTG (mM)	0,4	0,4	0,4	0,8	0,8	0,8	0,4	0,4	0,4	0,8	0,8	0,8
Temperatura de indução (°C)	25	25	25	25	25	25	37	37	37	37	37	37
Tempo de indução (horas)	3	6	24	3	6	24	3	6	24	3	6	24

Após o período de expressão, as células foram centrifugadas a 3.000x*g* por 30 minutos e congeladas.

3.7.4. Verificação da atividade específica e produtividade

Os testes realizados para avalizar as condições de indução foram: atividade específica (U/mg $_{\text{de proteína}}$), produtividade específica (U/g $_{\text{de célula}}$) e produtividade volumétrica (U/L $_{\text{de meio cultivado}}$).

As células foram lisadas por choque osmótico com a utilização do reagente *BugBuster Master* MIX (Novagen®) obedecendo a proporção de 5 mL de reagente para cada 1 g de célula, conforme recomendações do fabricante. O

lisado celular foi centrifugado a 16.000x*g* por 20 minutos e as células foram coletadas. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm (Millipore) e utilizado para medida da atividade enzimática.

A quantificação proteica total foi realizada com o método de BRADFORD, 1976, técnica amplamente utilizada para a determinação da concentração de proteínas totais por meio da utilização do corante de "*Coomassie Blue* G-250. Este método é baseado na interação entre o corante e as macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. O corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

Para a quantificação de proteínas realizaram-se diluições das amostras proteicas em uma solução diluída de Bradford (1:5, conforme indicação do fabricante *Bio Rad*) e construiu-se uma curva padrão com BSA (SIGMA-ALDRICH) variando a concentração de 0 a 1,2 mg/mL, e por regressão linear obteve-se a equação 4:

$$\text{Absorbância} = 1{,}475.[\text{proteína}] + 0{,}0877;\ r^2 = 0{,}9961 \qquad \text{(Equação 4)}$$

A concentração da proteína de interesse foi quantificada através da interpolação dos valores de absorbância obtidos na curva padrão construída.

A atividade específica da proteína e a produtividade específica e volumétrica foram calculadas pelo método de Nessler, como descrito em 3.4.3, exceto pela quantificação proteica, que foi realizada pelo método de Bradford. Ainda com relação à quantificação proteica, como "branco" foi utilizado um lisado de células que não foi submetida à fase de indução, garantindo dessa maneira que a leitura das amostras seja próximo da proteína de interesse produzida pela indução com IPTG e não apenas a L-ASNase endógena da bactéria hospedeira.

3.7.5. Escolha dos parâmetros de produção da enzima recombinante em escala laboratorial

A escolha dos melhores parâmetros estudados para a produção da enzima recombinante se baseou nos valores obtidos de atividade específica e

produtividade específica e volumétrica. Além desses valores, foi considerado a quantidade de indutor utilizada e tempo de processo.

3.8. Criação da estrutura reduzida da ErA

A construção de uma enzima com tamanho reduzido foi realizada de acordo com o esquema representado na Figura 7.

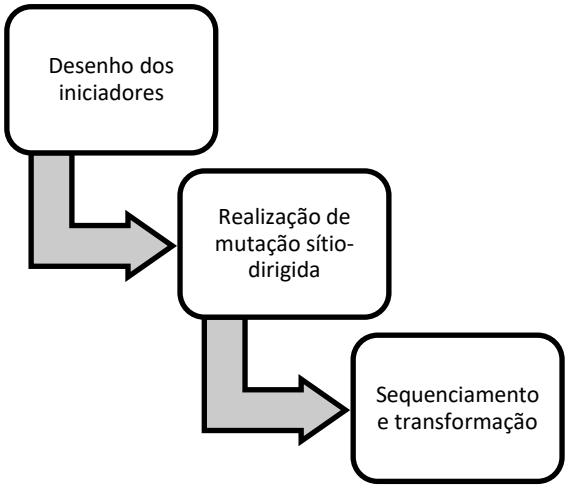


Figura 7. Esquema da metodologia da construção de uma enzima de tamanho reduzido.

3.8.1. Desenho dos iniciadores para ErA reduzida

Os iniciadores foram desenhados conforme descrito em 3.3.1., com intuito de inserir um “stop códon” no resíduo 213, região onde se desejava truncar a enzima. As sequências nucleotídicas estão indicadas abaixo:

Zip FW 5'- GCG TCT TTG ATG TGC GCT GAC TGA CCT CTC TGC CG -3'

Zip RV 5'- CGG CAG AGA GGT CAG TCA GCG CAC ATC AAA GAC GC -3'

3.8.2. Mutação sítio-dirigida

O kit da Agilent *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* foi utilizado para realizar a mutação sítio-dirigida, seguindo o protocolo do fabricante: 1 ng/µL de molde (pET-15b+*asnB- 50 ng)*, 2,5 ng/µL de cada primer FW e Rev (125 ng/µL),

5 µL de tampão 10X, 1µL de DNTP mix, 41 µL de água milli-Q e 0,05 U/µL de *Pfu* turbo polimerase (2,5 U/µL). As condições de amplificação consistiram em uma fase inicial de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, seguida de 16 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 68 °C por 1 minuto/Kb de plasmídeo (7 minutos) e uma fase final de extensão a 68 °C por 7 minutos. Em seguida, a reação foi incubada com 1 µL da enzima *DpnI* (10 U) a 37 °C por 1 hora para digestão do DNA parental metilado. Essa reação foi dialisada por 20 minutos em 20 mL de água milli-Q com membrana de 0,025 µm de poro.

A transformação foi realizada em *E. coli* (DH5α) com 3 µL da reação dialisada e cinco clones foram selecionados para a extração plasmidial (conforme descrito em 3.3.2). A inserção ou não da mutação foi analisada após sequenciamento dos clones, de acordo com o descrito no item 3.4.5.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Obtenção da ErA selvagem

A construção foi feita de modo que a proteína produzida fosse secretada para o periplasma, característica essencial para a realização desse trabalho, uma vez que a triagem de uma biblioteca com mais de mil clones seria inviável caso fosse necessário realizar a purificação de cada proteína produzida ou necessitasse de rompimento celular. Para garantir a viabilidade do projeto, o gene *asnB* foi inserido no vetor pET15b com sequencia sinal endógena, o que possibilitou a secreção da proteína produzida, possibilitando o processo de triagem.

E. coli é geralmente o hospedeiro de primeira escolha para produzir proteínas heterólogas (SCHLEGEL et al., 2013) e foi escolhido como hospedeiro do plasmídeo recombinante de expressão. Diversos fatores justificam a escolha da *E. coli* como hospedeiro, por exemplo: a superprodução e purificação de uma proteína recombinante em *E. coli* pode ser mais rápido, mais barato e mais fácil do que a partir de outros organismos (BERKMEN, 2012).

O fato de o clone construído secretar a proteína de interesse para a região periplasmática possibilitou que a biblioteca de mutantes pudesse ser triada por meio do cálculo da atividade. É mais fácil isolar proteínas do compartimento periplasmático do que de lisados intracelulares (SCHLEGEL et al., 2013).

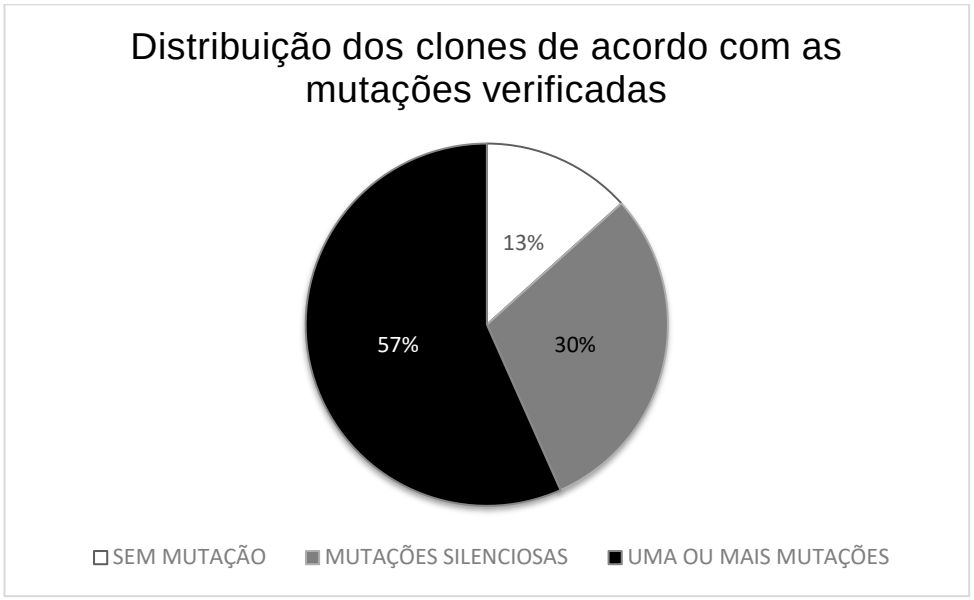
4.2. Produção e triagem da biblioteca de mutantes

Foi produzida uma biblioteca com 1.056 clones advindos de epPCR. A atividade L-ASNase desses clones na fração periplasmática foi testada, e o critério de seleção foi feito de acordo com as atividades volumétricas que apresentaram, sendo o valor mínimo de 80% da atividade da enzima selvagem usado para que o clone fosse selecionado.

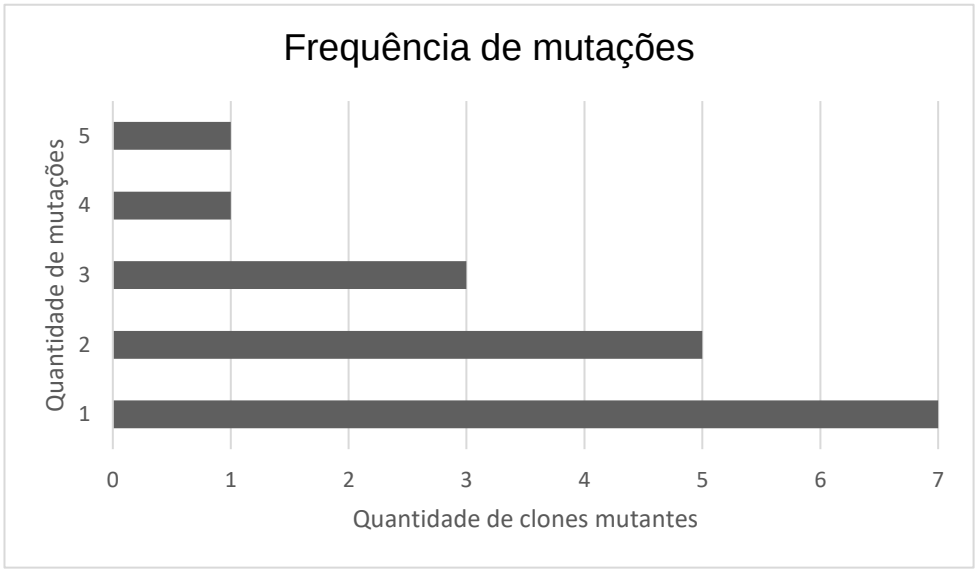
Foi testada também a atividade L-ASNase em bactérias sem o inserto de interesse, ou seja, bactérias da linhagem de BL21(DE3) transformadas com o vetor pET15b vazio, chamado de controle negativo. Essas bactérias sem o inserto foram cultivadas e induzidas nas mesmas condições dos clones da biblioteca para que fossem utilizadas como “branco”. A diferença de absorbância observada entre as amostras com o inserto (ou seja, capaz de produzir L-ASNase recombinante) e sem o inserto (produzindo apenas L-ASNase endógena, não super expressa e de *E. coli*) foi utilizada na interpolação com a curva padrão, para então encontrar o valor de amônio resultante da reação de depleção da asparagina pela L-ASNase recombinante produzida. Esse tipo de controle é muito importante para eliminar a possibilidade de que o amônio medido fosse derivado do próprio metabolismo bacteriano, o qual poderia superestimar a produção de L-ASNase.

Com base nesse critério foram selecionados 30 clones, os quais foram sequenciados geneticamente para confirmação da presença ou não de mutações. Quatro clones não possuíam nenhuma mutação e nove clones tiveram mutações silenciosas, ou seja, apesar de haver ocorrido mutação em algum nucleotídeo, essa troca não resultou em alteração do aminoácido codificado na proteína produzida, devido à degeneração do código genético. Dezessete clones, o que corresponde a 57% dos previamente selecionados, apresentaram mutações que resultaram em alteração de algum aminoácido na

constituição da proteína (Figura 8A). A quantidade de mutação em cada clone variou entre uma e cinco mutações (Figura 8B). Conforme discutido por RASILA et al., 2009, o método de PCR propensa a erros com DNA polymerase Mutazyme II, utilizado nesse trabalho, é muito eficiente para a produção de biblioteca com baixa a média taxa de mutações.



(A)



(B)

Figura 8. A. Distribuição dos clones selecionados de acordo com a presença ou ausência de mutação resultante em alteração de aminoácidos da proteína. B. Frequência de mutações verificadas nos clones selecionados.

4.3. Avaliação da atividade específica

Apenas os clones com mutação que resultaram na substituição de pelo menos um aminoácido foram selecionados para a avaliação da atividade específica do extrato periplasmático, obtido por meio do choque osmótico. As mutações resultantes de cada um dos 17 mutantes selecionados até o momento são inéditas e estão apresentadas na Tabela 4. A atividade específica calculada de cada enzima está indicada na Figura 9.

Tabela 4. Denominação dos clones selecionados e as respectivas mutações (substituição de aminoácidos).

Enzima	**Mutações**				
2 - 8G	G → D	N → D	L → V		
3 - 5A	V → A				
4 - 3G	L → P	D → N			
4 - 6E	A → S				
5 - 4C	K → E	K → Q			
5 - 9H	G → D	R → C	S → N		
6 - 5B	G → S	D → E	A → T		
7 - 8F	E → D				
7 - 9C	Q → S	V → M			
7 - 10B	R → C				
7 - 12G	V → I	Y → D			
8 - 5C	V → A	V → A	T → I	N → S	D → N
8 - 9F	A → V	P → L			
9 - 5F	A → T	T → S	Q → E	V → M	
9 - 6D	K → I				
10 - 6D	A → T				
11 - 2B	L → M				

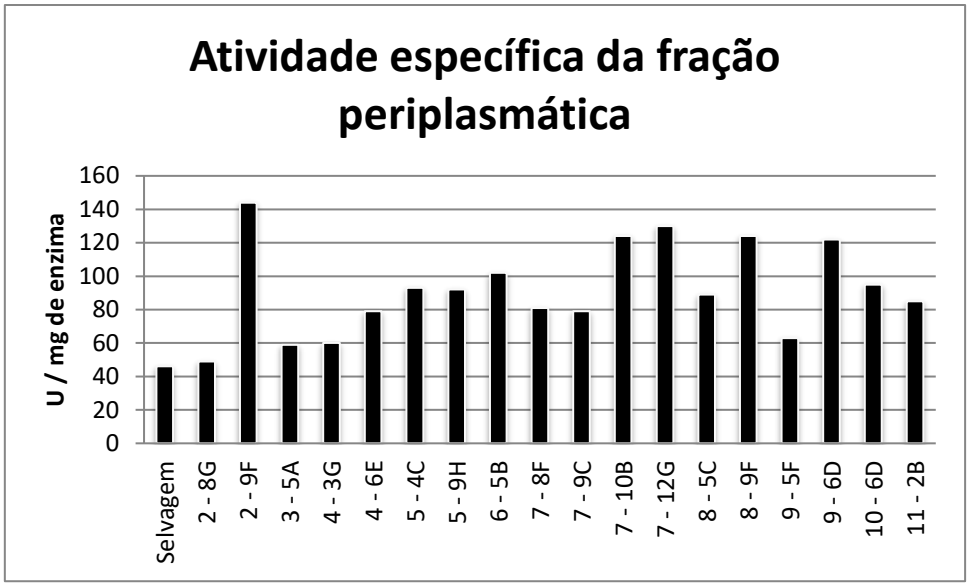


Figura 9. Valor de atividade específica calculada a partir da fração periplasmática de cada mutante.

A análise mais detalhada e confiável da atividade asparaginásica e glutaminásica de cada enzima exigiu um estudo de purificação, que resultou na realização de duas etapas de purificação (descrito em 3.5.1): cromatografia de troca catiônica e exclusão molecular, ambas realizadas em FPLC. A padronização do método de purificação foi realizada com a enzima selvagem e depois de validado, o método foi utilizado para as enzimas mutantes.

A primeira etapa de purificação foi a de troca catiônica, em que todas as enzimas demostraram o mesmo padrão: grande quantidade de impurezas foi lavada com tampão Fosfato de potássio 20 mM pH 5,8 e posteriormente, a proteína foi eluída com tampão Fosfato de potássio 20 mM pH 7,5. O resultado da purificação encontrada nesse trabalho foi distinta do apresentado por KOTZIA e LABROU (2007), em que a eluição da ErA ocorreu em pH 8,5. A diferença dos pontos isoelétricos verificados pode indicar o motivo da diferença do pH da eluição das enzimas. KOTZIA e LABROU (2007) consideraram o ponto isoelétrico teórico da ErA como 8,57, enquanto que nesse trabalho o resultado encontrado no portal Expasy foi de 7,23 para a ErA selvagem sem a sequência sinal (1 a 21). A figura 10A representa o cromatograma derivado dessa primeira etapa de purificação.

A segunda etapa consistiu na purificação por exclusão molecular, em que todas as enzimas foram eluídas em tempos de retenção bem parecidos ao tempo observado no cromatrograma da Figura 10B.

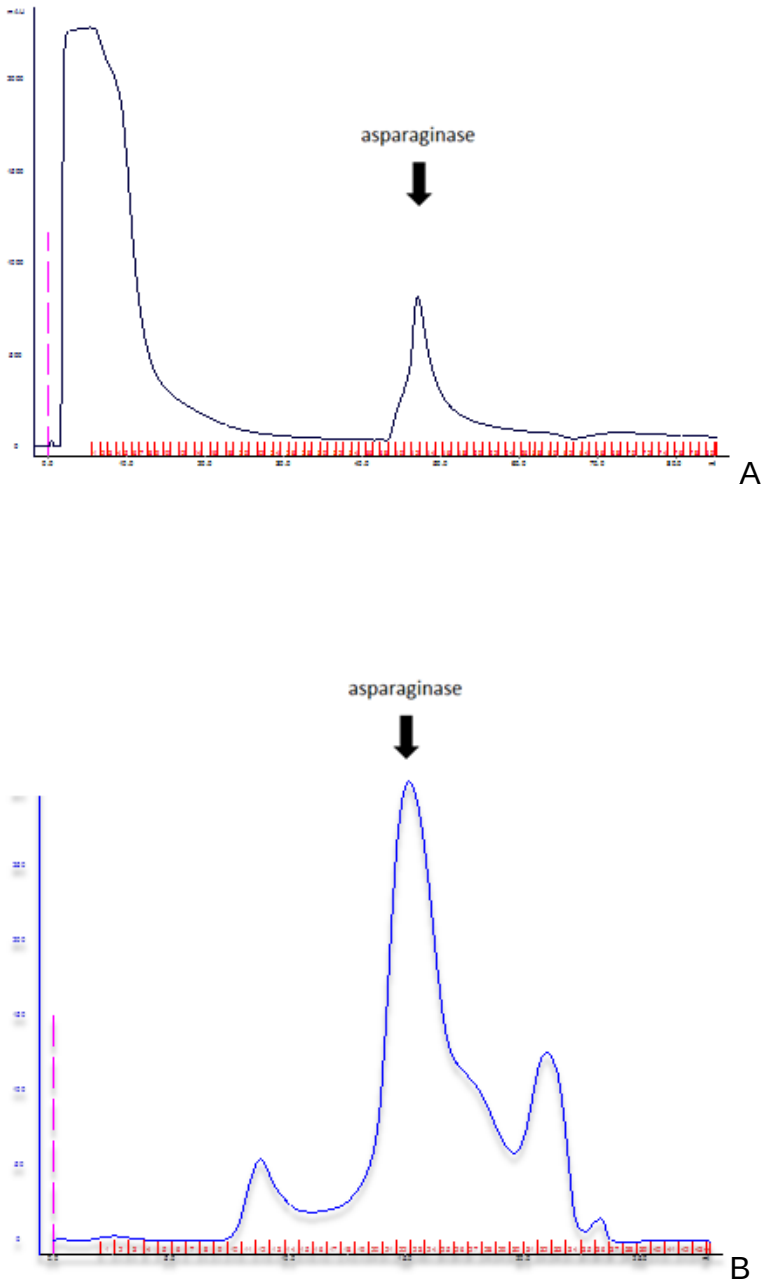


Figura 10. Cromatogramas de purificação da enzima selvagem por troca catiônica (A) e exclusão molecular (B). As abscissas indicam a intensidade de absorção detectada e as ordenadas o volume (mL) de tampão utilizado correspondente à detecção.

As frações referentes aos picos destacados, extraídos de cada etapa de purificação foram submetidas à verificação por eletroforese, por meio do SDS-Page, indicadas na Figura 11:

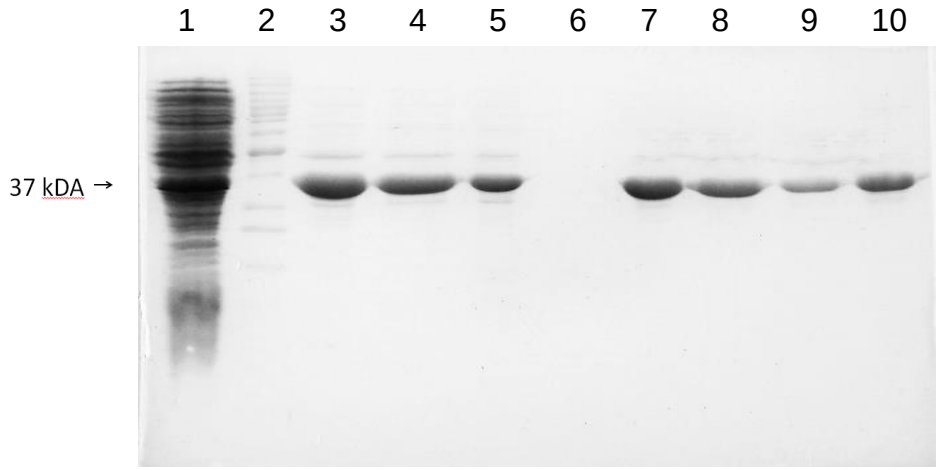


Figura 11. Verificação da purificação das enzimas. SDS-PAGE de enzima selvagem. Cada coluna representa uma porção obtida nas purificações: da direita para esquerda: extrato bruto (1), marcador de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (INVITROGEN) (2), frações resultantes da troca catiônica (3 a 6), frações resultantes da exclusão molecular (7 a 10).

Todas as enzimas recombinantes foram purificadas e confirmadas da mesma forma. O padrão mostrado nas Figuras 10 e 11 foram encontrados nas demais enzimas.

Após as purificações, as enzimas tiveram as atividades específicas (asparaginásica e glutaminásica) testadas e os resultados encontrados estão indicados na Tabela 5. As enzimas obtidas dos mutantes 5-4C e 10-6D, cujos valores estão indicados como “ – ”, perderam a atividade durante o processo de purificação.

Tabela 5. Valor da atividade específica asparaginásica e glutaminásica correspondente às proteínas recombinantes purificadas.

	Atividade Específica (U/mg)		
Enzima	Asparaginásica	Glutaminásica	% (Glut/Asp)
Selvagem	**211**	**36**	**17**
2 - 8G	173	19	10
3 - 5A	158	27	17
4 - 3G	196	35	18
4 - 6E	185	29	16
5 - 4C	-	-	-
5 - 9H	135	36	27
6 - 5B	63	12	19
7 - 8F	198	28	14
7 - 9C	121	15	12
7 - 10B	164	31	19
7 - 12G	157	36	23
8 - 5C	144	32	22
8 - 9F	183	29	16
9 - 5F	**241**	**20**	**8**
9 - 6D	**201**	**47**	**23**
10 - 6D	-	-	-
11 - 2B	148	11	7

Já era esperado que os valores da atividade específica fossem distintos depois da purificação, uma vez que o método utilizado para o cálculo da atividade em periplasma não é específico, além de ser indireto. Por isso a importância da purificação para a seleção dos mutantes.

De acordo com a Tabela 5, foi possível verificar que enzimas derivadas de 11 mutantes tiveram uma diminuição da atividade asparaginásica específica maior que 10%, quando comparada à enzima selvagem. Baseado no critério estabelecido para a seleção dos mutantes mais promissores, os mutantes 2-8G, 3-5A, 4-6E, 5-9H, 6-5B, 7-9C, 7-10B, 7-12G, 8-5C, 8-9F e 11-2B foram excluídos dos estudos posteriores.

As enzimas recombinantes 4-3G, 7-8F e a 9-6D apresentaram diminuição do valor da atividade específica quando comparada a enzima selvagem. Porém essa diminuição foi menor que 10% e pode estar ligada ao erro

do método. Dessas 3 enzimas, a 9-6D demostrou uma característica distintas das demais: um aumento significativo da atividade específica glutaminásica.

Embora a maioria dos pesquisadores busque a diminuição ou até eliminação da atividade glutaminásica, esse ainda é um tema controverso. PARMENTIERA et al. (2015) afirma que sem a atividade glutaminásica a enzima não possui citotoxidade suficiente para combater as células tumorais, e, portanto, não cumpririam seu propósito como possível alternativa em uma futura aplicação no tratamento de LLA. EMADI et al., 2018 estudaram a utilização de ErA no tratamento de leucemia mieloide aguda (LMA), uma vez que as células neoplásicas dessa doença requerem glutamina para síntese de componentes celulares essenciais para a sobrevivência. O grupo sugere que a depleção de glutamina induzida por L-ASNase pode ter um importante papel no manejo de pacientes com LMA, e indica a importância de estudos direcionados ao tratamento da LMA. Nesse contexto a enzima 9-6D não foi excluída, uma vez que a atividade especifica asparaginásica se manteve e a glutaminásica aumentou 30%, ambos valores comparadas com a enzima selvagem.

A enzima mutante 9-5F foi a que apresentou alteração nos valores de atividade específica asparaginásica e glutamínasica. A atividade específica asparaginásica aumentou 16% e a glutaminásica diminuiu 47%, comparada a enzima selvagem. Vale destacar que essa diferença foi notada em todos os testes realizados com a enzima 9-5F, cujas purificações foram realizadas de diferentes cultivos (replicatas biológicas). A diminuição da atividade glutaminásica poderia contribuir para a diminuição de diversos efeitos adversos derivados do tratamento com L-ANase. A neurotoxicidade, por exemplo, a qual acredita-se ser causada pela depleção da L-glutamina (NARTA et al., 2007) e que ocorre em aproximadamente 25% dos pacientes adultos. Outros efeitos adversos importantes também estão associados com a depleção da L – glutamina, como imunodepressão, pancreatites, danos hepáticos e hiperglicemia (SUDHIR et al., 2014; RAMYA et al., 2011).

Os gráficos de atividade específica (asparaginásica e glutaminásica) da enzima 9-5F estão representados nas Figura 12.

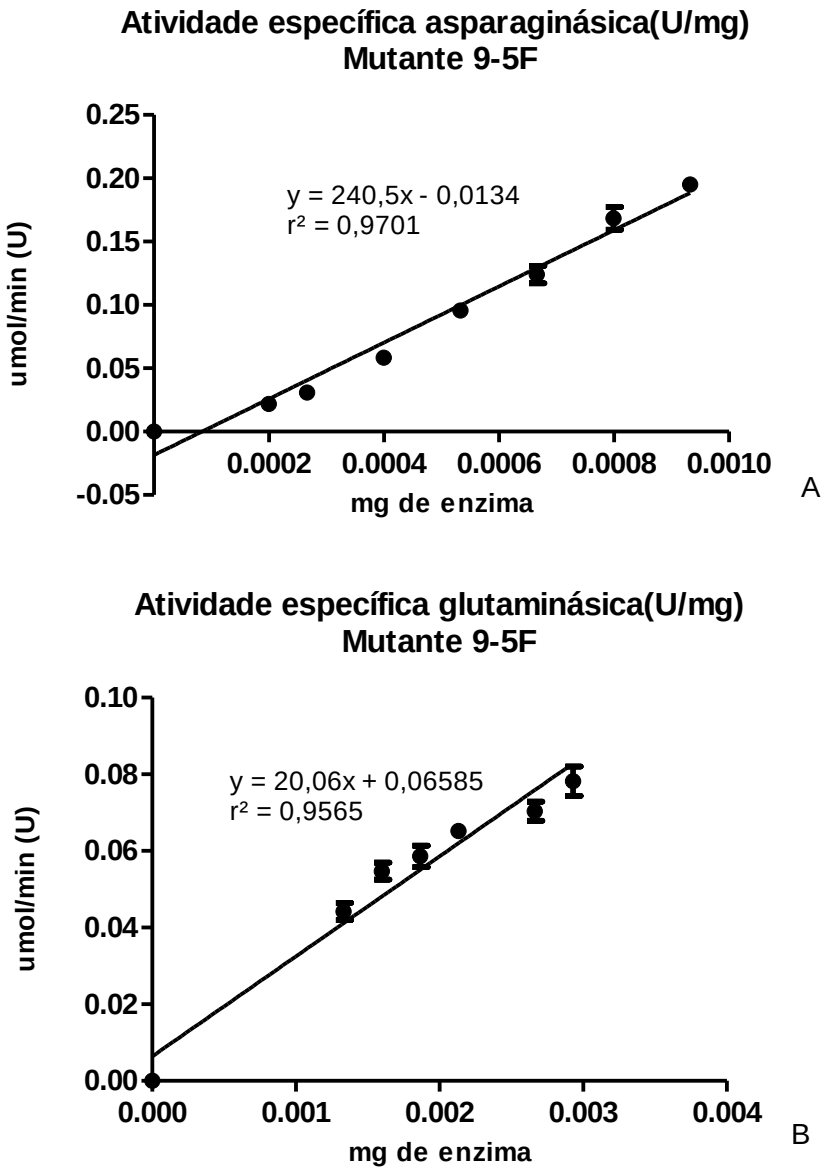


Figura 12. Atividade específica (A) asparaginásica e (B) atividade glutaminásica do mutante 9-5F. O coeficiente angular da equação de reta representa a atividade em U/mg de proteína, pois 1U = 1 µmol/min.

4.4. Avaliação da desordem estrutural

Determinadas mutações podem alterar regiões de proteínas, aumentando ou diminuindo a desordem geral de cada molécula. As regiões desordenadas são definidas como regiões que não possuem uma estrutura terciária fixa (www.pondr.com). A diminuição de alguma região desordenada

poderia diminuir a mobilidade favorecendo uma maior população de moléculas com conformação mais estável para a ligação do substrato. Por outro lado, aumento de desordem estrutural pode favorecer a velocidade de reação pelo aumento da mobilidade estrutural. Esses poderiam ser motivos do aumento da atividade específica de alguns mutantes.

Utilizando o preditor bioinformático PONDR®, foram feitas diversas simulações, comparando a desordem estrutural das enzimas mutantes com a da enzima de tipo selvagem. O principal objetivo foi verificar primeiramente se houve ou não alteração da desordem das proteínas e, no caso de alguma alteração, analisar se estava ou não relacionada com a mutação de cada enzima.

As enzimas 9-5F e 9-6D foram selecionadas para o estudo da desordem estrutural devido aos valores de atividade específica asparaginásica e glutaminásica apresentados na Tabela 5. As simulações foram realizadas pelos métodos PONDR®-VLXT e PONDR®-VLS2. A enzima derivada do mutante 9-5F não apresentou alterações na desordem estrutural quando comparada a enzima selvagem. Já enzima 9-6D apresentou alterações significativas dos valores de desordem estrutural por ambos métodos (VLXT e VLS2), comparada à enzima selvagem. Os resultados das pontuações fornecidas foram adaptados do formato original do PONDR® e estão demonstrados abaixo:

Análise pelo método *VLXT NNP STATISTICS* : Enzima Selvagem
Resíduos previstos: 327
Número de regiões desordenadas: 5
Número de resíduos desordenados: 114
Porcentagem global desordenada: 34.86
Pontuação média: 0.3524
Segmento de desordem prevista [13]-[31]: Pontuação = 0.8123
Segmento de desordem prevista [61]-[62]: Pontuação = 0.5141
Segmento de desordem prevista [65]-[73]: Pontuação = 0.5442
Segmento de desordem prevista [128]-[158]: Pontuação = 0.6498
Segmento de desordem prevista [247]-[298]: Pontuação = 0.7613

Análise pelo método *VLXT NNP STATISTICS* : Enzima 9-6D
Resíduos previstos: 327
Número de regiões desordenadas: 5
Número de resíduos desordenados: 94

Porcentagem global desordenada: 28.75
Pontuação média: 0.3352
Segmento de desordem prevista [13]-[31]: Pontuação = 0.8123
Segmento de desordem prevista [61]-[62]: Pontuação = 0.5141
Segmento de desordem prevista [65]-[73]: Pontuação = 0.5442
Segmento de desordem prevista [128]-[138]: Pontuação = 0.6482
Segmento de desordem prevista [247]-[298]: Pontuação = 0.7613

Análise pelo método *VSL2 NNP STATISTICS* : Enzima Selvagem
Resíduos previstos: 327
Número de regiões desordenadas: 7
Número de resíduos desordenados: 48
Porcentagem global desordenada: 14.68
Pontuação média: 0.3381
Segmento de desordem prevista [1]-[4]: Pontuação = 0.5975
Segmento de desordem prevista [18]-[27]: Pontuação = 0.5501
Segmento de desordem prevista [55]-[64]: Pontuação = 0.5573
Segmento de desordem prevista [144]-[147]: Pontuação = 0.5735
Segmento de desordem prevista [282]-[291]: Pontuação = 0.5272
Segmento de desordem prevista [293]-[297]: Pontuação = 0.5107
Segmento de desordem prevista [323]-[327]: Pontuação = 0.6005

Análise pelo método *VSL2 NNP STATISTICS* : Enzima 9-6D
Resíduos previstos: 327
Número de regiões desordenadas: 6
Número de resíduos desordenados: 44
Porcentagem global desordenada: 13.46
Pontuação média: 0.3315
Segmento de desordem prevista [1]-[4]: Pontuação = 0.5975
Segmento de desordem prevista [18]-[27]: Pontuação = 0.5501
Segmento de desordem prevista [55]-[64]: Pontuação = 0.5573
Segmento de desordem prevista [282]-[291]: Pontuação = 0.5272
Segmento de desordem prevista [293]-[297]: Pontuação = 0.5107
Segmento de desordem prevista [323]-[327]: Pontuação = 0.6005

A predição por PONDR®-VLXT mostrou que houve uma diminuição na quantidade de resíduos desordenados: enquanto a enzima selvagem apresentou 114 resíduos classificados como desordenados, a enzima

mutante 9-6D apresentou apenas 94. A região [128] - [158] classificada como desordenada na enzima selvagem diminuiu na enzima 9-6D e passou a ser classificada como desordenada entre os resíduos [128] - [138]. A diminuição dos 20 resíduos desordenados foi observada na região em torno da mutação, a qual pode ter contribuído para a diminuição da desordem nessa região específica. A Figura 13 representa as simulações realizadas no PONDR®-VLXT com a enzima selvagem e a mutante 9-6D.

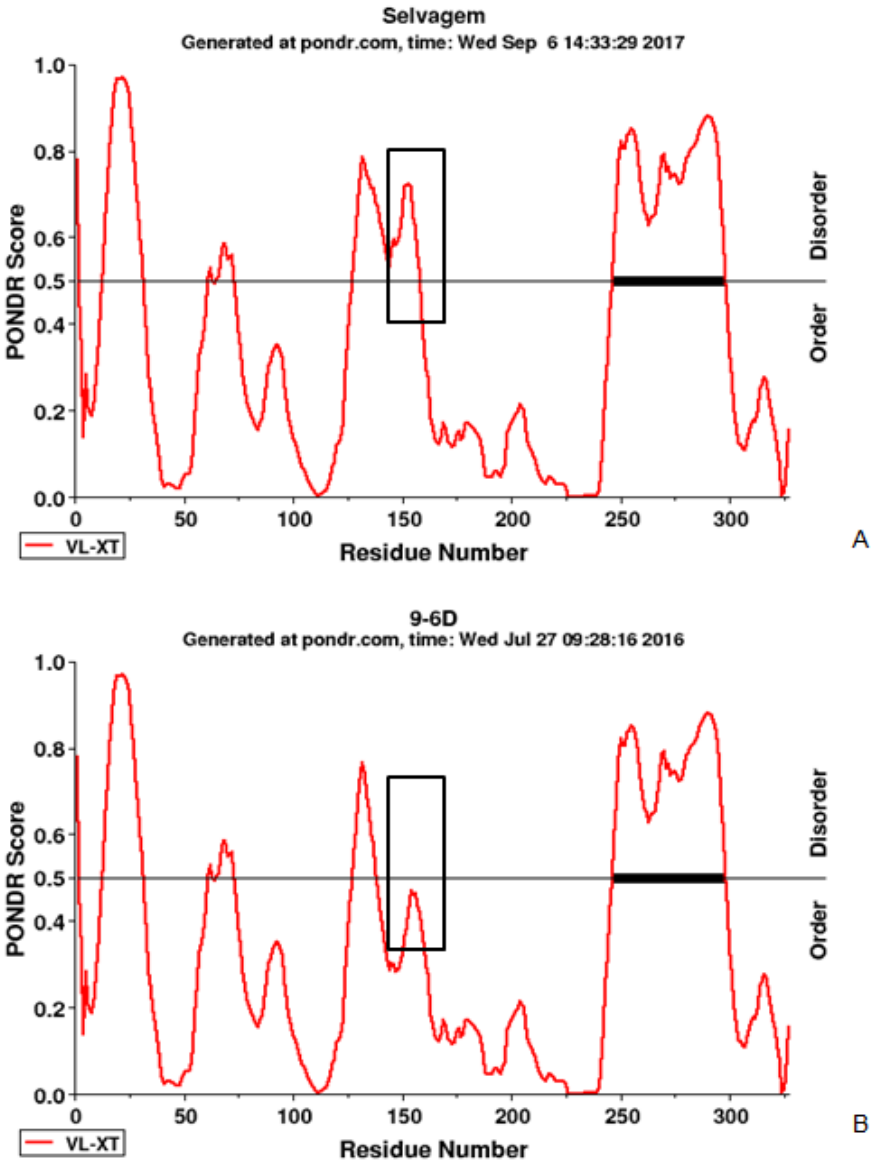


Figura 13. Representação das simulações realizadas em PONDR®-VLXT para a enzima selvagem (A) e a enzima mutante 9-6D (B).

Já a predição realizada por PONDR®-VLS2, representada pela Figura 14, classificou na enzima selvagem 7 regiões como desordenadas e apenas 6 na enzima mutante 9-6D.

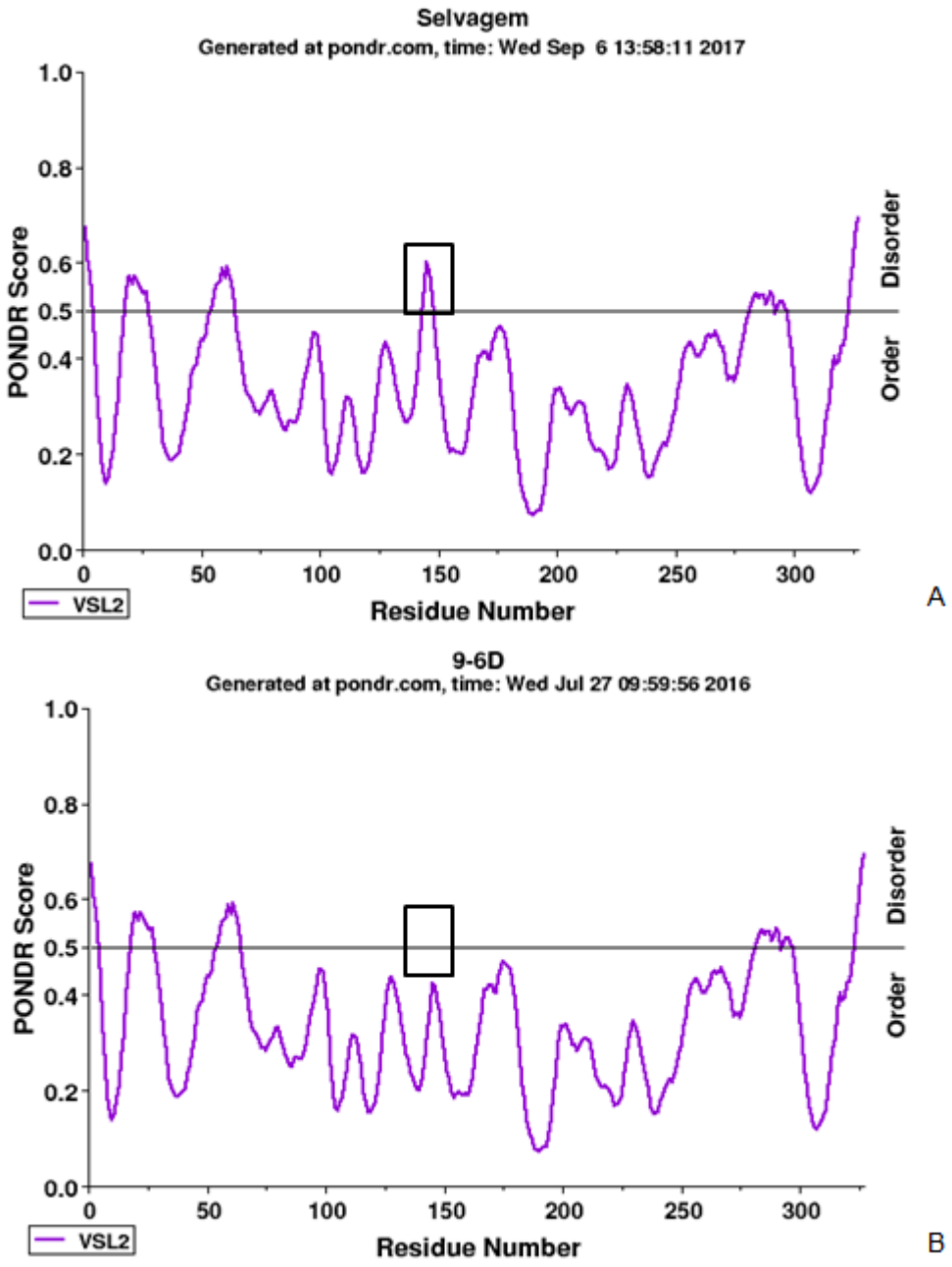


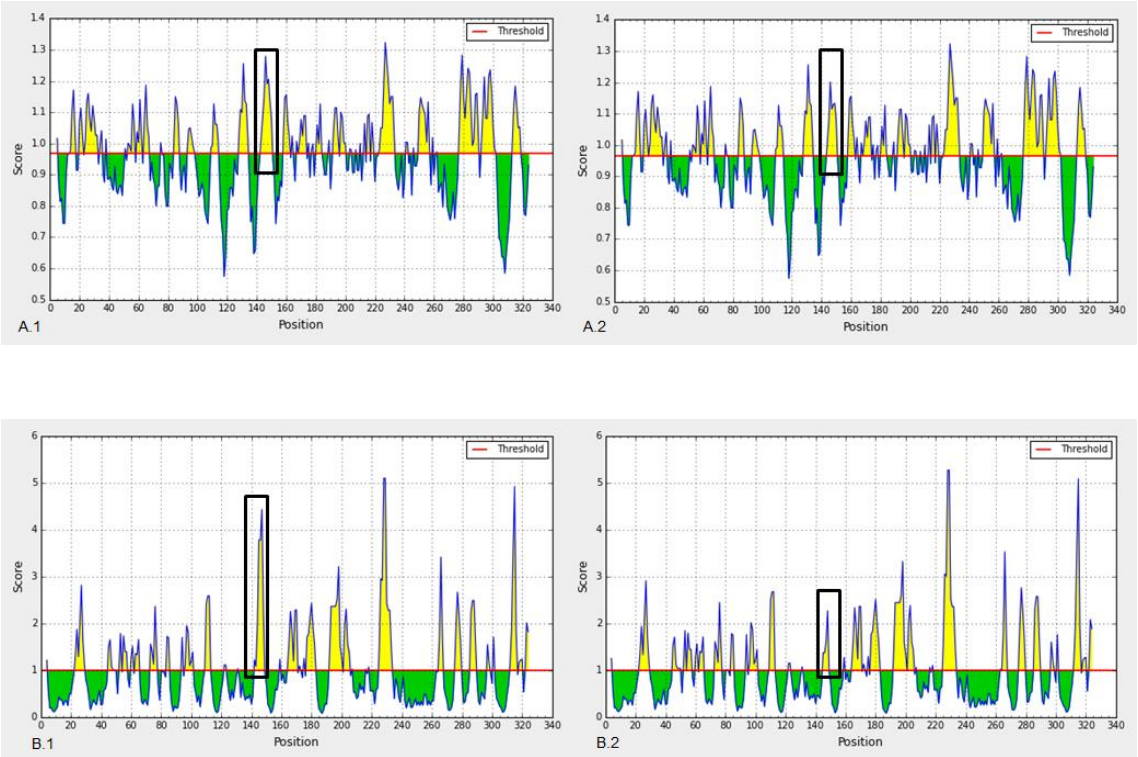
Figura 14. Representação das simulações realizadas em PONDR®-VSL2 para a enzima selvagem (A) e a enzima mutante 9-6D (B).

4.5. Análise dos epítopos imunogênicos

As sequências de aminoácidos das enzimas selvagem e mutantes 9-5F e 9-6D foram submetidas ao preditor IEDB para a determinação dos epítopos antigênicos. Uma definição simples de epítopo pode ser considerada como partes de uma molécula que são especificamente reconhecidas por moléculas do sistema imunológico. RAMYA & PULICHERLA (2015) identificaram estas regiões para alguns tipos de L-ASNases.

O objetivo foi investigar se algum dos mutantes selecionados produziria uma enzima cuja imunogenicidade fosse menor que a da enzima selvagem. A comparação foi realizada por quatro dos métodos disponíveis no IEDB para predição de regiões epitópicas de células B.

A enzima 9-5F manteve a mesma pontuação de imunogenicidade da enzima selvagem. Contudo, a enzima 9-6D revelou diminuição de regiões imunogênicas por todos os métodos. A Figura 15 representa graficamente a pontuação da enzima selvagem e da mutante 9-6D, com destaque para a região onde foi verificada alteração na imunogenicidade.



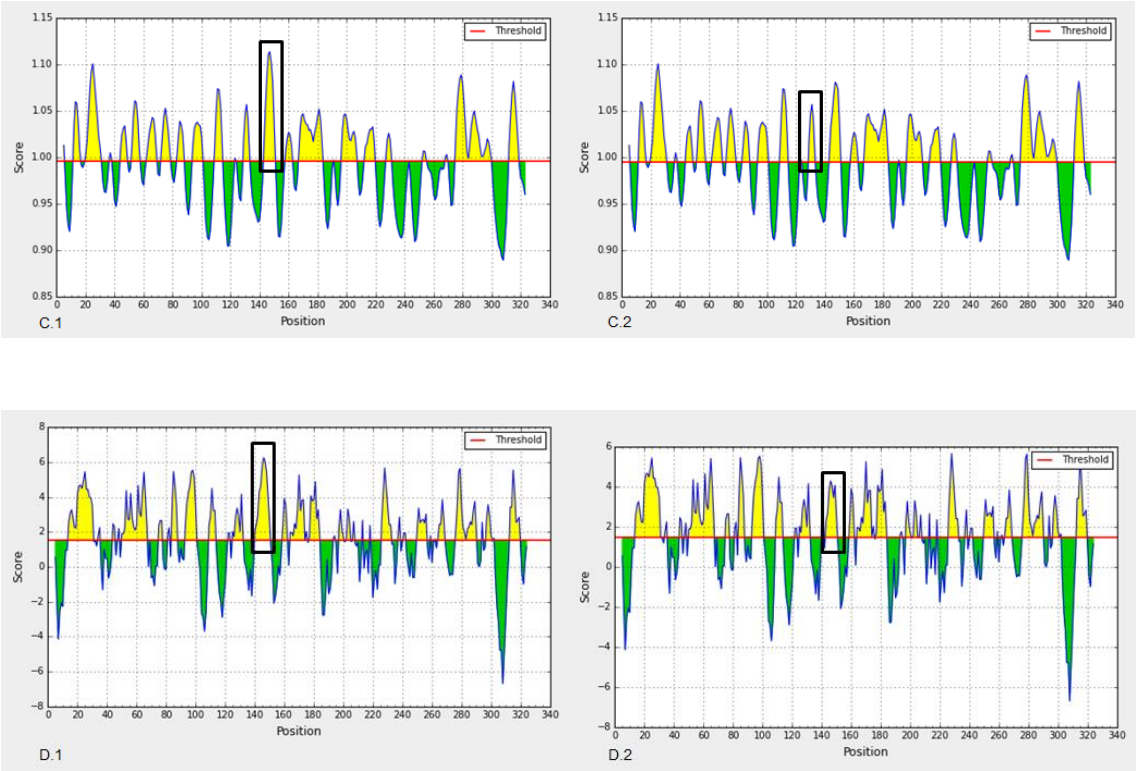


Figura 15. Representação das simulações realizadas em IEDB. A. Simulações realizadas pelo método *Chou & Fasman Beta-Turn* para a enzima selvagem (A.1) e mutante 9-6D (A.2); B. Simulações realizadas pelo método *Emini Surface Accessibility* para a enzima selvagem (B.1) e mutante 9-6D (B.2); C. Simulações realizadas pelo método *Karplus & Schulz Flexibility* para a enzima selvagem (C.1) e mutante 9-6D (C.2); D. Simulações realizadas pelo método *Parker Hydrophilicity* para a enzima selvagem (D.1) e mutante 9-6D (D.2).

De acordo com a Figura 15, as alterações ocorreram na região em torno do resíduo em que ocorreu a mutação da enzima 9-6D. As análises realizadas pelos métodos de Karplus & Schulz e Parker indicaram que a região estudada deixou de ser a região com maior pontuação imunogênica da enzima.

Além da visualização gráfica, foi realizada a comparação dos valores de pontuação obtida entre os resíduos da região que compreende o resíduo mutado na enzima 9-6D. Os valores de pontuação estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6. Pontuações referentes a regiões imunogênicas obtidas pelo IEDB da enzima selvagem e da mutante 9-6D.

Método	Pontuação	
Chou & Fasman Beta-Turn	Selvagem	1.15
	Mutante 9-6D	1.073
Emini Surface Accessibility	Selvagem	3.785
	Mutante 9-6D	1.372
Karplus & Schulz Flexibility	Selvagem	1.086
	Mutante 9-6D	1.048
Parker Hydrophilicity	Selvagem	5.743
	Mutante 9-6D	3.786

Assim como verificado na Figura 15, os resultados da Tabela 6 demostraram a diminuição da pontuação obtida por todos os métodos utilizados, sugerindo que a mutação realmente contribuiu para a diminuição das regiões epitópicas para células B. A diminuição dos valores foi mais significativa na análise realizada pelo método de Emini, em que foi verificada uma redução de quase 3 vezes na pontuação. MOOLA et al. (1994), observaram que a substituição de prolina por qualquer outro aminoácido reduziria a imunogenicidade de regiões consideradas mais imunogênica da ErA. Por meio de mutações sitio-dirigidas, obtiveram o mutante P285T, em que foi observada importante redução da imunogenicidade da ErA. Nesse trabalho, foi verificado *in silico*, pelo PONDR que a substituição de uma lisina (K) por uma isoleucina (I) também contribuiu para a diminuição da imunogenicidade da região do mutada.

4.6. Avaliação da resistência a proteases

Considerando os resultados da Tabela 5, os clones 9-5F e 9-6D foram selecionados para testar a resistência proteica mediante a incubação com Catepsina B (CTSB) e Asparaginil endopeptidase (AEP). SHRIVASTAVA et al. 2015 indicam a possibilidade de que enzimas que possuem maior resistência às proteases tendem a ter um aumento do tempo de meia vida. Isso acarretaria em

benefícios para o paciente, como a diminuição da frequência de aplicações da enzima.

O clone 9-5F foi selecionado para essa análise, pois foi o único que apresentou melhora na atividade asparaginásica e diminuição da atividade glutaminásica comparada à enzima selvagem. GERVAIS et al. (2014) criaram mutantes de ErA visando a melhora da atividade específica e estabilidade da enzima, bem como redução da atividade glutaminásica. Esses autores estudaram a mutação de asparagina (N) para ácido aspártico (D) em duas posições: N41D e N281D. A mutação N281D resultou na diminuição da atividade glutaminásica (para 1,9%), quando comparada à enzima selvagem, mas acarretou também na diminuição da estabilidade da enzima a altas temperaturas.

Contudo, a diminuição da atividade glutaminásica ainda gera controvérsias. De acordo com PARMENTIERA et al. (2015), a atividade asparaginásica sozinha pode não ser suficiente para explicar a citotoxicidade da L-ASNase em muitos casos de LLA. Esses autores mostraram que a enzima que possuía a atividade glutaminásica mais alta de todas as proteoformas de L-ASNases testadas, também foi a mais efetiva na prevenção de crescimento tumoral, enquanto que mutantes sem atividade glutaminásica foram eficazes, com citotoxicidade mensurável em apenas três das onze linhagens celulares testadas.

Nesse contexto, a enzima mutante 9-6D também foi selecionada, pois além de manter a atividade específica asparaginásica apresentou aumento da atividade especifica glutaminásica, ambas comparadas à enzima selvagem.

A Figura 16 demostra os géis SDS-PAGE resultantes das análises após incubação das enzimas selecionadas com as proteases. As duas enzimas mutantes 9-5F e 9-6D (Figura 16B) mantiveram as mesmas características da enzima selvagem (Figura 16A) e não apresentaram melhora com relação à estabilidade mediante a Catepsina B (CTSB) e Asparaginil endopeptidase (AEP). Contudo, esses testes são importantes para provar que as mutações não geraram sensibilidade da L-ASNase as proteases, o que poderia ser uma desvantagem. Todas elas mantiveram o mesmo padrão da ErA já discutido por PATEL et al., (2009), ou seja, são resistentes à degradação por AEP, porém sensível à degradação por CTSB.

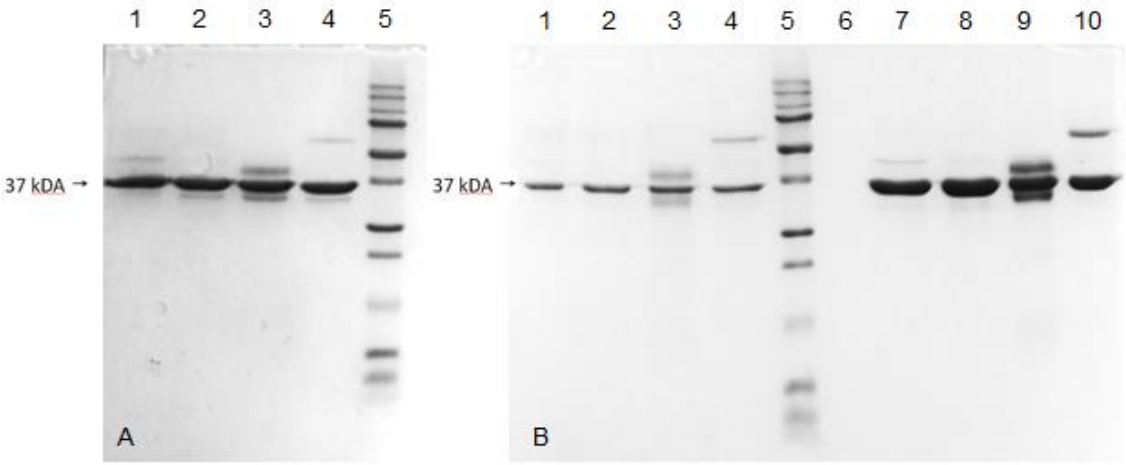


Figura 16. SDS-PAGE das enzimas selvagem, 9-5F e 9-6D após incubação com AEP e CTSB. A. Enzima Selvagem (Da direita para esquerda: (1) enzima mantida a 5 °C - controle 1, (2) enzima mantida a 37 ºC – controle 2, (3) enzima com CTSB a 37 ºC, (4) enzima com AEP a 37 ºC, (5) marcador de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (INVITROGEN). B. Enzimas mutantes (Da direita para esquerda: (1) enzima 9-5F mantida a 5 °C - controle 1, (2) enzima 9-5F mantida a 37 ºC – controle 2, (3) enzima 9-5F com CTSB a 37 ºC, (4) enzima 9-5F com AEP a 37 ºC, (5) marcador de massa molecular *BenchMark Protein Ladder* (INVITROGEN), (6) poço vazio, (7) enzima 9-6D mantida a 5 °C - controle 1, (8) enzima 9-6D mantida a 37 ºC – controle 2, (9) enzima 9-6D com CTSB a 37 ºC e (10) enzima 9-6D com AEP a 37 ºC.

4.7. Seleção do clone mais promissor

Após a realização dos testes descritos anteriormente, concluiu-se que cada clone analisado (9-5F e 9-6D) possui alguma característica melhorada quando comparada à enzima selvagem. A enzima 9-5F demostrou ligeiro aumento da atividade específica asparaginásica e diminuição da atividade especifica glutaminásica. Já a 9-6D apresentou diminuição da pontuação de desordem estrutural e diminuição de regiões imunogênicas, ambas analisadas *in silico* e aumento da atividade glutaminásica.

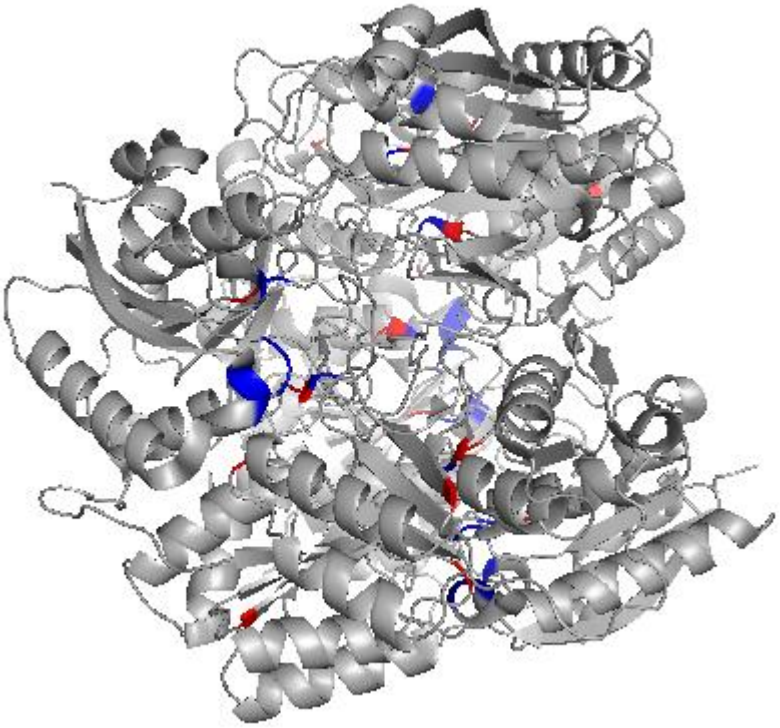
Pelo fato da enzima mutante 9-6D ter apresentado características melhoradas apenas pelas análises *in silico*, e considerando que a atividade

glutaminásica, apesar de ter sido demostrada como mais efetiva na prevenção do crescimento tumoral (PARMENTIERA et al. 2015), é considerada causadora de diversos efeitos adversos no tratamento de LLA (NARTA et al., 2007; SUDHIR et al., 2014; RAMYA et al., 2011), selecionamos a proteoforma 9-5F. A enzima 9-5F foi considerada mais promissora, pois apresentou um ligeiro aumento no valor da atividade específica asparaginásica e diminuição da metade do valor da atividade glutaminásica, sendo enzimas com menor atividade glutaminásica consideradas mais seguras (NGUYEN, H. A., SU, Y. & LAVIE, A., 2016).

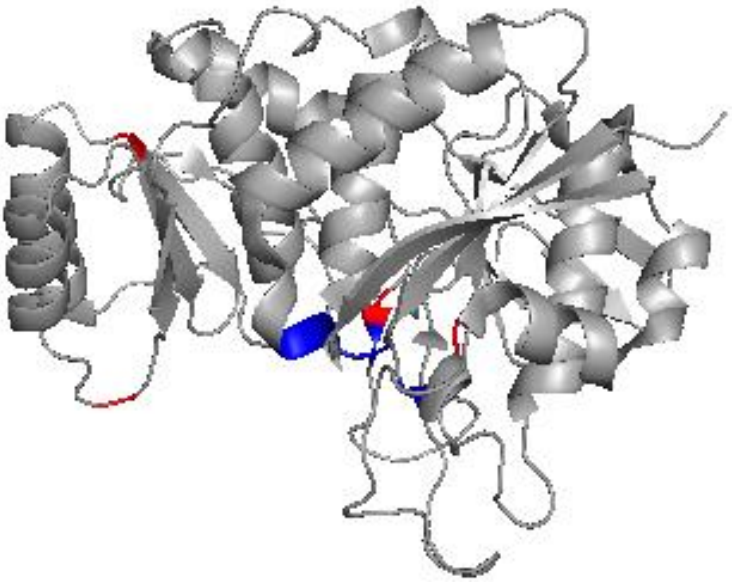
A visualização dos modelos estruturais cristalográficos para a enzima 9-5F foi obtida pelo programa Pymol. A estrutura base para a criação dos modelos foi a referenciada como 1O7J no PDB. A partir dela, os resíduos do sítio ativo e as mutações foram destacadas. O sítio ativo da ErA é mediado principalmente pelos resíduos: Thr15, Glu63, Asp96, Ser62, Thr95 Ala120 a Lys168 (GERVAIS et al. 2014, NGUYEN, H. A., SU, Y. & LAVIE, A. 2016).

A enzima mutante 9-5F possui 4 mutações: A→T, T→S, Q→E e V→M. Considerando que a região N-terminal da ErA é inerentemente móvel (NGUYEN, H. A., SU, Y. & LAVIE, A. 2016), duas das mutações ocorreram nessa região, e duas na região C-terminal. As duas mutações que ocorreram na região N-terminal estão localizadas ao lado de dois resíduos ligados ao sítio ativo (GERVAIS et al. 2014, NGUYEN, H. A., SU, Y. & LAVIE, A. 2016).

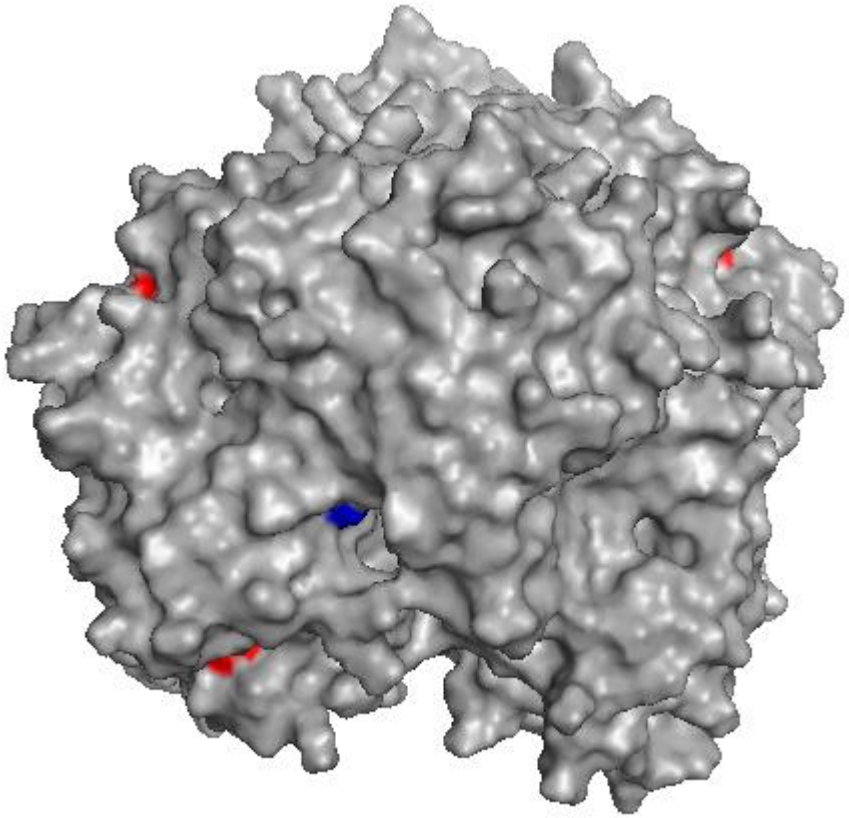
Já com relação à localização na formação da estrutura quaternária, apenas a mutação V→M ocorreu na superfície do tetrâmetro, as demais ocorreram na parte interna da molécula (Figura 16C). A Figura 17 representa o modelo cristalográfico da estrutura referenciada como 1O7J com a inserção das mutações do clone 9-5F em *cartoon* e superfície:



A.



B.



C.

Figura 17. Modelo estrutural cristalográfico da mutante 9-5F. O sítio ativo mediado pelos resíduos Thr15, Glu63, Asp96, Ser62, Thr95, Ala120 e Lys168 estão destacados em azul e as mutações em vermelho. A. *Cartoon* do tetrâmero. B. *Cartoon* do monômero. C. Superfície do tetrâmero. As figuras foram criadas a partir de estrutura 1O7J do PDB utilizando o software PyMOL.

4.8 Caracterização da enzima selecionada

Um dos motivos da seleção da enzima derivada do clone 9-5F foi pelo fato de ter sido verificado a metade do valor da atividade glutaminásica, comparada à enzima selvagem. Todavia, a utilização de um método diferente para o cálculo das atividades específicas é recomendada, para confirmar se a diferença encontrada pelo método de Nessler não deriva de um erro do próprio método utilizado. Dessa forma, as atividades específicas (asparaginásica e glutaminásica) das enzimas selvagem e mutante foram testadas pelo ensaio acoplado à GDH. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 7:

Tabela 7. Valores de atividade específica calculadas pelo método de ensaio acoplado à GDH.

Enzima	Atividade específica asparaginásica (U/mg)	Atividade específica glutaminásica (U/mg)	% Atividade glutaminásica/Atividade asparaginásica
Selvagem	473	99	21
9-5F	491	60	12

A obtenção de valores de atividade específica diferentes dos adquiridos pelo método de Nessler já eram esperados, considerando que cada método possui interferentes e sensibilidades diferentes. Além disso, o método de Nessler é considerado um método direto enquanto o ensaio acoplado à GDH é considerado um método indireto. Vale destacar que independentemente do método utilizado foi verificada a diminuição da atividade glutaminásica da enzima 9-5F.

A alteração de valores de atividade específica de uma enzima indica que parâmetros cinéticos foram alterados. A cinética asparaginásica e glutaminásica das enzimas selvagem e 9-5F foram estudadas pelo método de ensaio acoplado à GDH e calculadas por meio do programa Graphpad, utilizando o modelo michaeliano. Os parâmetros calculados pelo programa estão demostrados na Tabela 8:

Tabela 8. Parâmetros cinéticos das atividades asparaginásica e glutaminásica das enzimas selvagem e mutante 9-5F.

Enzima	K*m* L- asparaginase (μM)	K*m* L-glutaminase (mM)
Selvagem	49,1 ± 3,5	0,8 ± 0,3
9-5F	51,6 ± 2,3	1,7 ± 0,4

Conforme observado na tabela 8, os valores de K_m da atividade de ErA obtidos nesse trabalho estão de acordo com o relatado na literatura (KOTZIA e LABROU 2007; NGUYEN, H. A., SU, Y. & LAVIE, A. 2016). Não foi verificada diferença significativa entre os K_m para atividade de ErA das enzimas selvagem e da mutante 9-5F.

NGUYEN, H. A., SU, Y. & LAVIE, A. (2016) estudaram parâmetros cinéticos da atividade de L-glutaminase da ErA e de mutantes obtidos por mutação sitio-dirigida. O K_m para L-glutamina da ErA selvagem encontrado por esses pesquisadores foi 0,36 ± 0,02 mM, enquanto que nesse trabalho o valor de K_m para enzima selvagem foi de 0,8 ± 0,3 mM. Apesar de haver diferença significativa entre os valores mencionados, ambos possuem a mesma ordem de grandeza. Já a enzima mutante 9-5F, apresentou K_m para L-glutamina de 1,7 ± 0,4 mM. Conforme observado anteriormente, pelo fato da enzima ter apresentado uma diminuição do valor da atividade específica glutaminásica, era esperado um aumento do valor do K_m.

Após obtenção dos parâmetros cinéticos, foi realizado o estudo de estabilidade, com intuito de verificar por quanto tempo a enzima mutante permanecia ativa, sem a adição de nenhum osmólito, quando armazenada em geladeira ou freezer. Vale destacar que, diferente do tampão utilizado para purificação descrito em 3.5.1, para a realização do estudo de estabilidade não foi adicionada glicina. De acordo com a Figura 18, é possível verificar que após 7 dias a enzima armazenada em geladeira perdeu aproximadamente 50% da atividade e depois de 11 dias a enzima já não possuía nenhuma atividade. OBREQUE 2017 realizou o estudo de estabilidade em função da temperatura de armazenamento a 4ºC da enzima comercial Crisantaspase e observou que a perda de 50% da atividade ocorreu também após 7 dias. A perda de atividade enzimática em função do tempo pode ser causada por agregação proteica ou instabilidade do tetrâmero, bem como ação de proteases (AVRAMIS 2012).

Já a enzima congelada teve a atividade específica praticamente constante até o 11º dia e a perda de 50% da atividade ocorreu no 30º dia.

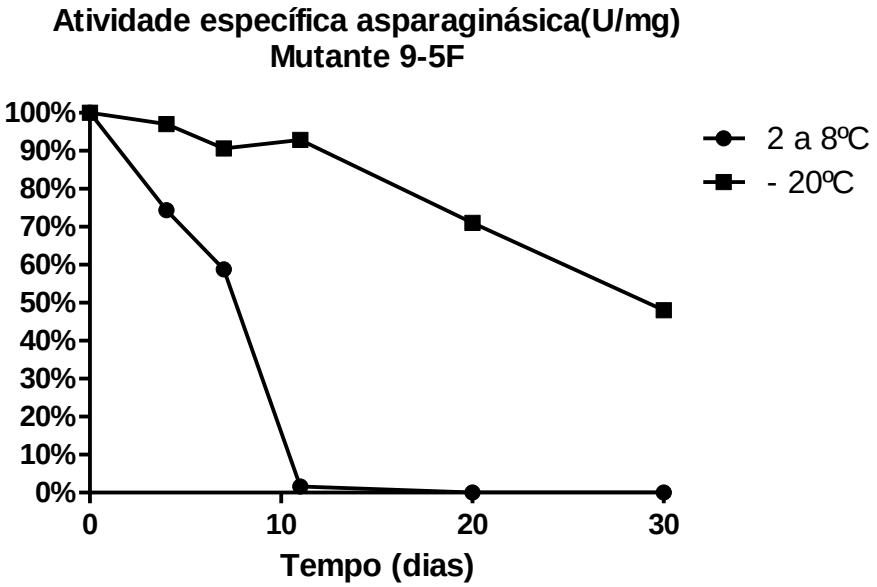


Figura 18. Porcentagem de atividade específica residual em função do tempo, de acordo com a temperatura de armazenamento da enzima mutante 9-5F.

Com relação às condições ótimas de atividade de acordo com pH e temperatura, o pH ótimo foi estabelecido na faixa de 6,8 a 8,8, com redução significativa da atividade asparaginásica em pH abaixo de 5,8 e acima de 10,8 (Figura 19 A). A mesma faixa foi verificada quando calculada a atividade específica glutaminásica (Figura 19 B).

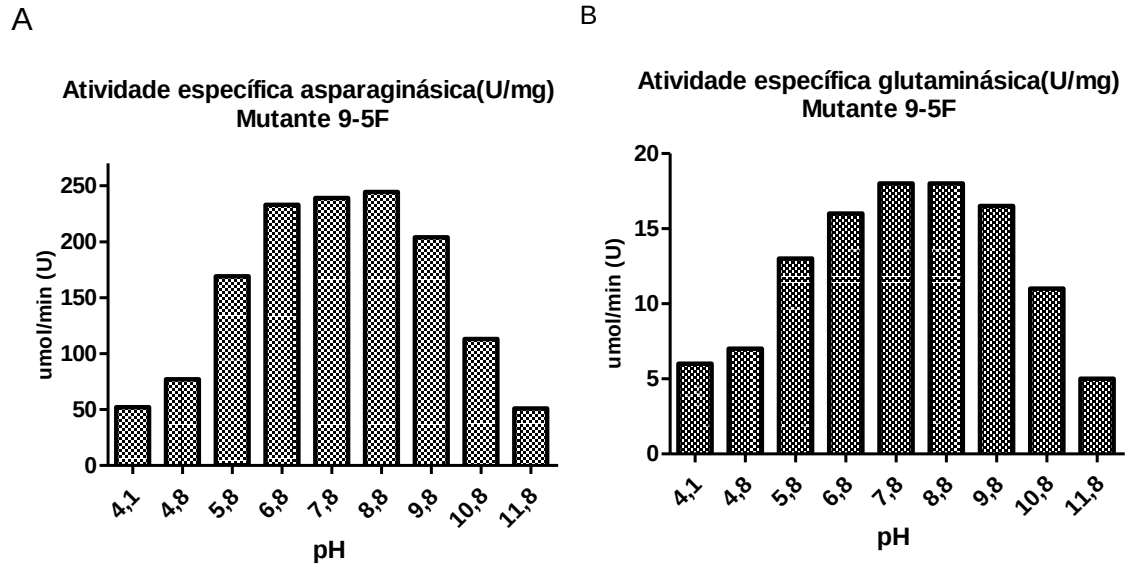


Figura 19. Atividade específica asparaginásica (A) e glutaminásica (B) de acordo com pH utilizado para a realização da reação de hidrólise.

Ao verificar a porcentagem de atividade glutaminásica diante da atividade asparaginásica (atividade glutaminásica/atividade asparaginásica), esperava-se que as porcentagens se mantivessem constantes, ou seja, com o aumento da atividade asparaginásica se esperaria um aumento da atividade glutaminásica, assim como a diminuição da atividade asparaginásica viria acompanhada da diminuição da atividade glutaminásica. Contudo, de acordo com a Figura 20, verificou-se que a faixa de pH ótimo é justamente aquela que apresenta a menor porcentagem de atividade glutaminásica, e que em faixas mais extremas as porcentagens apresentaram a tendência de aumentar.

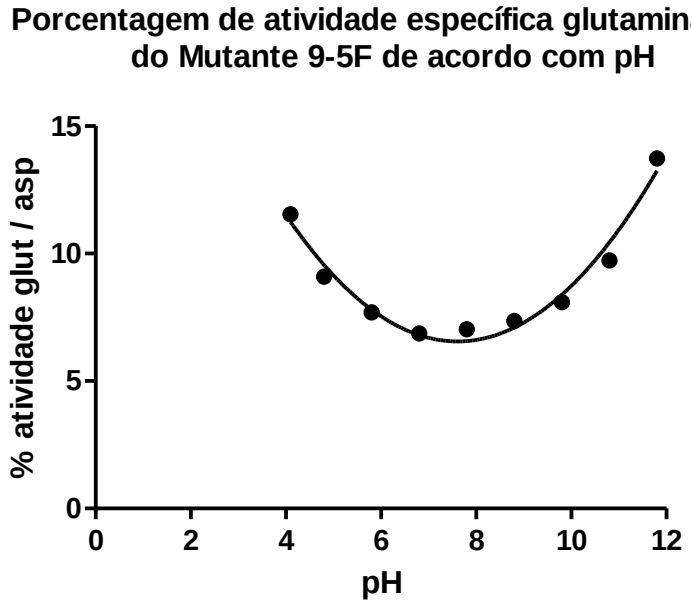
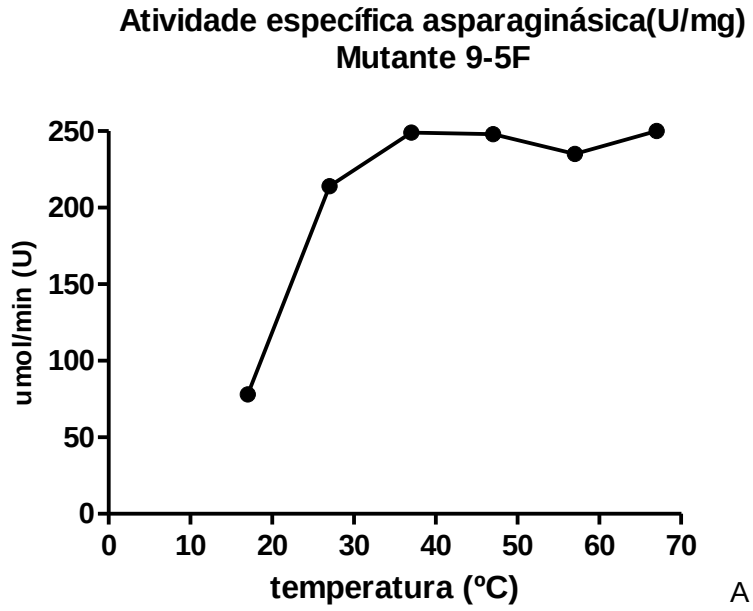
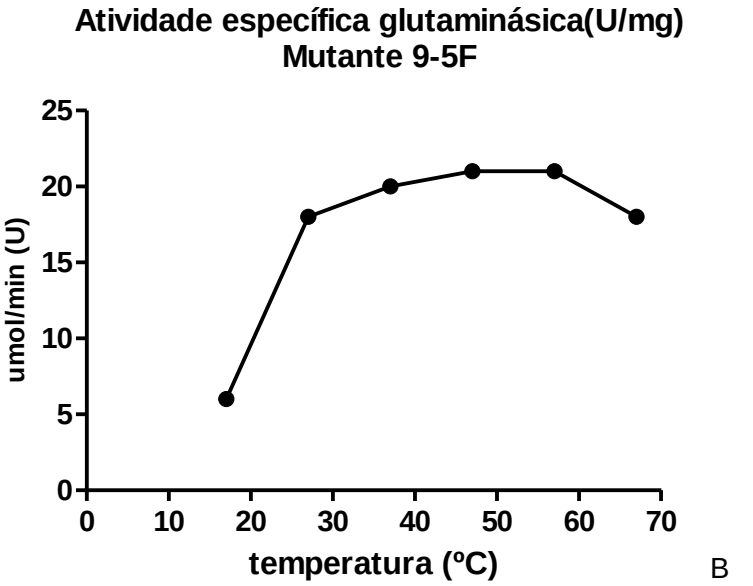


Figura 20. Porcentagem de atividade glutaminásica de acordo com pH utilizado para a realização da reação de hidrólise.

A temperatura ótima de reação foi verificada incubando a reação de hidrólise em diferentes temperaturas. A Figura 21 mostra os valores de atividade específica asparaginásica (Figura 21 A) e glutaminásica (Figura 21 B) de acordo com a temperatura de incubação testada. A partir de 37ºC a atividade se manteve alta e praticamente constante, o que a princípio poderia causar estranheza. Entretanto, ao verificar o tempo de reação, os resultados são os esperados, uma vez que o tempo de reação é de apenas 11 minutos.



A



B

Figura 21. Atividade específica asparaginásica (A) e glutaminásica (B) de acordo com temperatura utilizada para a realização da reação de hidrólise.

Com relação à porcentagem de atividade glutaminásica, os valores encontrados foram constantes, de acordo com o esperado, e não se verificou nenhuma tendência nos dados em função da temperatura, conforme verificado na Figura 22.

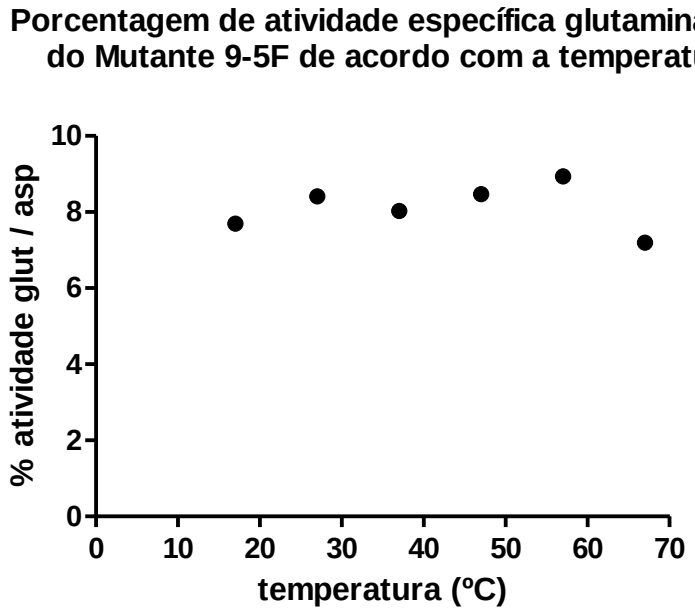


Figura 22. Porcentagem de atividade glutaminásica de acordo com a temperatura utilizada para a realização da reação de hidrólise.

A estabilidade térmica da enzima mutante 9-5F foi avaliada medindo a sua atividade residual após tratamento térmico de 45 minutos em diferentes temperaturas, sendo considerado o valor de 100% para a enzima congelada. A incubação da enzima pelo período especificado em temperaturas até 37 º C não interferiu na atividade específica da enzima. Todavia, quando a enzima foi incubada a 47 ºC e 57 ºC a queda do valor da atividade especifica residual foi de 43% e 12%, respectivamente (Figura 23). KOTZIA e LABROU (2009) realizaram o estudo da estabilidade térmica da enzima ErA selvagem e do mutante D133V pelo período de 7,5 minutos, e verificaram que a ErA selvagem e a mutante D133V perderam 50% de atividade quando submetida a temperatura de aproximadamente 47 ºC e 56 ºC, respectivamente. A mutante 9-5F estudada nesse trabalho apresentou a queda de 50% de atividade na mesma temperatura observada para a ErA selvagem, ambas a 47 º C, apesar de o tempo de incubação da mutante 9-5F ter sido aproximadamente cinco vezes maior. Diante desse resultado, é possível afirmar que as mutações do clone 9-5F não diminuíram a estabilidade térmica da enzima, quando comparada a enzima selvagem. Testes com períodos de incubação menores podem ser sugeridos para comparar e verificar a possibilidade do aumento da estabilidade térmica da mutante 9-5F.

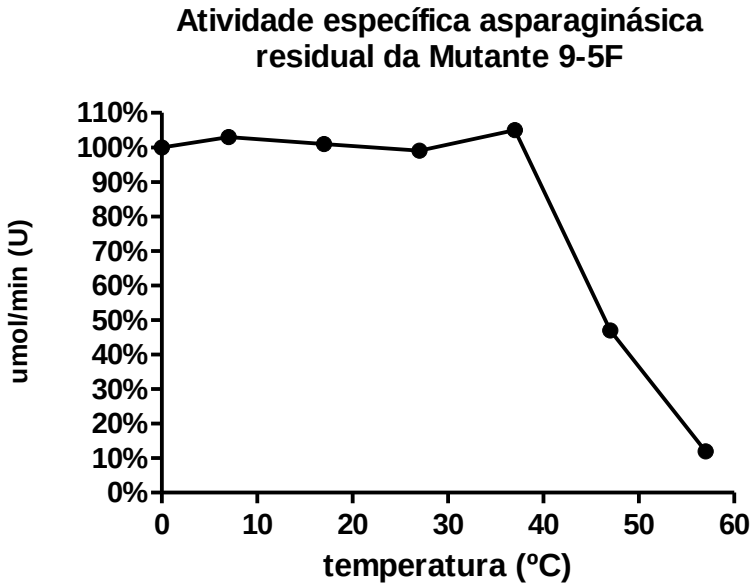


Figura 23. Atividade específica asparaginásica residual após tratamento térmico de 45 minutos nas temperaturas descritas.

4.9. Otimização de parâmetros na produção de ErA

As condições de indução, como o tipo de meio de cultura, a concentração de indutor, a temperatura e o tempo pós-indução, demonstraram influenciar a expressão da proteína em *E. coli* (ASHAYERI-PANAH et al. 2017). A avaliação de alguns desses fatores foram estudados para otimização da produção do clone mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*), uma vez que a enzima obtida por esse clone apresentou diminuição de aproximadamente 50% do valor da atividade glutaminásica (19 U/mg de enzima) comparada à enzima selvagem (36 U/mg de enzima)

O primeiro estudo foi a avaliação do crescimento celular em seis diferentes meios de cultivo: LB, SB, SB3, TB, TB5 e TY. Os valores de biomassa foram calculados a partir da equação de correlação entre OD e massa seca (equação 3) e então a curva de crescimento do mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*) foi construída, considerando a função logarítmica de biomassa em função do tempo para cada meio de cultivo, todas apresentadas na Figura 24.

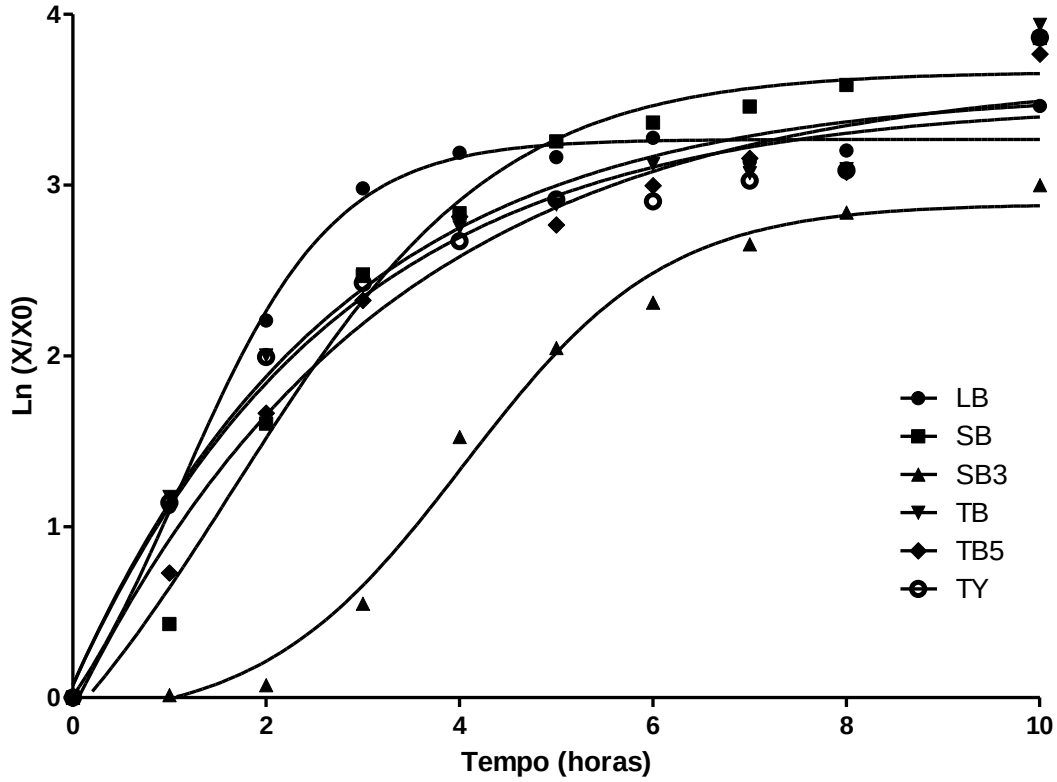


Figura 24. Curva de crescimento celular do mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*) em diferentes meios de cultivo.

Baseado nas curvas de crescimento construídas (Figura 24), com exceção da curva derivada do meio SB3 que demonstrou produção de biomassa inferior, não foi verificada diferença entre a biomassa obtida nos diferentes meios em função do tempo. Por esse motivo, optou-se por manter o meio LB para os experimentos seguintes, por ser um meio mais simples e econômico, com relação aos outros meios avaliados. O resultado encontrado nesse trabalho difere do estudo realizado por ROMANO et al. 2009, para expressão da proteína recombinante de hDAAO, expressa em *E. coli BL21 (DE3) Star*. Esse grupo também testou os meios LB, SB, SB3, TB, TB5 e TY, porém verificaram a pior produção de biomassa no meio LB, e a melhor no TB.

O segundo parâmetro utilizado para avaliação da produção de ErA pelo mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*) foi a velocidade de agitação. O objetivo foi

verificar se o aumento ou diminuição da velocidade de agitação resultaria em alguma melhoria na obtenção da ErA. As velocidades testadas foram de 150 rpm, 180rpm e 250 rpm. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação entre os valores obtidos de atividade específica (U/mg de proteína), produtividade específica (U/g célula) e produtividade volumétrica (U/L de meio cultivado) resultante do crescimento do mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*) em diferentes velocidades de agitação (rotatória).

Velocidade de agitação (rpm)	**Produtividade específica (U/g)**	**Produtividade volumétrica (U/L)**	**Atividade Específica (U/mg)**
150	21,9 ± 2,2	90,8 ± 7,7	229,8 ± 11,4
180	22,8 ± 1,9	91,2 ± 6,1	226,4 ± 10,8
250	23,5 ± 2,8	92,6 ± 5,3	201,7 ± 9,9

De acordo com os valores obtidos na tabela 9, não houve alteração significativa nos resultados produzidos pelos diferentes parâmetros analisados. Decidiu-se manter a velocidade de agitação de 180rpm para a execução dos outros testes, por ser a velocidade normalmente utilizada no laboratório onde foram realizados esses experimentos.

Os demais parâmetros avaliados, concentração do indutor, temperatura e tempo de indução foram estados simultaneamente, de acordo com as condições apresentadas na Tabela 3.

A tabela 10 mostra os resultados obtidos da produtividade específica (U/g de célula), da produtividade volumétrica (U/L de meio) e da atividade específica (U/mg de proteína total) de cada condição apresentada na Tabela 3. No tempo de 24h de cultivo os resultados obtidos foram indicados como “*” pois os valores encontrados foram próximos a zero. Outros pesquisadores relataram que tempos de incubação mais longos e temperaturas mais elevadas podem ter efeitos desfavoráveis na produção de proteínas, especialmente em formas solúveis (LARENTIS, A.L., SAMPAIO, H.C.C., MARTINS, O.B. et al. 2011; SWALLEY et al. 2006). Nesse trabalho esse efeito desfavorável foi verificado em

todas as situações em que o tempo de incubação foi mais longo (24 horas), no qual não foi possível calcular os parâmetros de produtividade e ou atividade da ErA mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*).

Tabela 10. Resultados da produtividade específica (U/g de célula), da produtividade volumétrica (U/L de meio) e da atividade específica (U/mg de proteína total) obtidos para o mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*), de acordo com a condição analisada.

Condições	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
U/g de célula	7,5 ±1,2	9,9 ±1,7	*	8,0 ±1,0	8,4 ±1,5	*	24,0 ±0,9	23,0 ±1,1	*	22,6 ±2,2	24,8 ±0,4	*
U/L de meio	46,5 ±3,1	42,0 ±7,2	*	38,3 ±4,7	42,3 ±2,1	*	96,3 ±3,5	94,1 ±2,9	*	96,7 ±5,7	97,8 ±7,0	*
U/mg de proteína	96,3 ±4,7	93,6 ±3,2	*	129,8 ±10,1	166,3 ±15,2	*	280,6 ±8,6	290,8 ±8,5	*	270,2 ±7,0	286,5 ±9,6	*

Ao avaliar os resultados de produtividade específica e volumétrica (Figura 25) foi possível verificar um padrão em todas as análises: as condições 1, 2, 4 e 5 cuja temperatura de indução foi de 25ºC apresentaram valores bem mais baixos que as condições 7, 8, 10 e 11, cuja temperatura de indução foi de 37ºC. ASHAYERI-PANAH et al. 2017 estudaram a otimização de expressão de Rv1733c de *Mycobacterium tuberculosis* expressa em *E. coli* e concluíram que temperaturas inferiores de indução (30 °C e 25 °C) causaram uma diminuição acentuada na expressão de Rv1733c, o que está de acordo com o observado nesse trabalho.

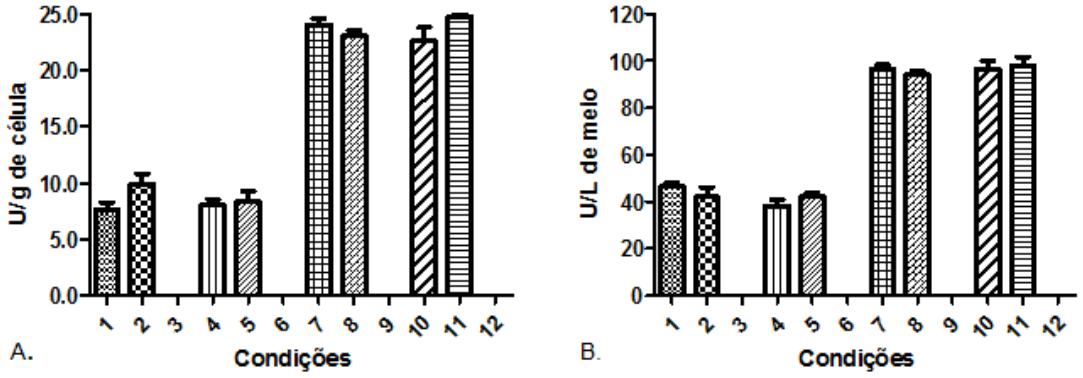


Figura 25. Produtividade específica (A) e volumétrica (B) de acordo com a condição avaliada para o mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*).

A temperatura pós-indução é um fator importante que afeta a expressão e a solubilidade da proteína recombinante (VINCENTELLI et al. 2011). Nesse trabalho, ao verificar diferença significativa nos valores de produtividade de acordo com a temperatura de indução, os resultados foram analisados considerando apenas esse fator. Foi calculada a média dos valores de produtividade (especifica e volumétrica) obtidos para cada temperatura, uma vez que não foi verificada diferença significativa entre os valores na mesma condição de temperatura.

Os valores de produtividade especifica obtidos a 25º C e 37º C (Figura 26 A) foram de 8,5 ± 1,5 U/g de célula e 23,6 ± 1,4 U/g, respectivamente. Esses valores indicam que a produtividade específica obtida a 37ºC foi de 2,8 vezes maior que a obtida a 25ºC. Já os valores obtidos para produtividade volumétrica (Figura 26 B) foram 42,3 ± 5,1 U/L a 25ºC e 96,2 ± 4,5 U/L a 37ºC, o que corresponde a uma diferença de 2,3 vezes entre as temperaturas analisadas. Assim como verificado em outros trabalhos (ASHAYERI-PANAH et al. 2017; SHAFIEE et al. 2017) a melhor expressão ocorreu a 37 °C.

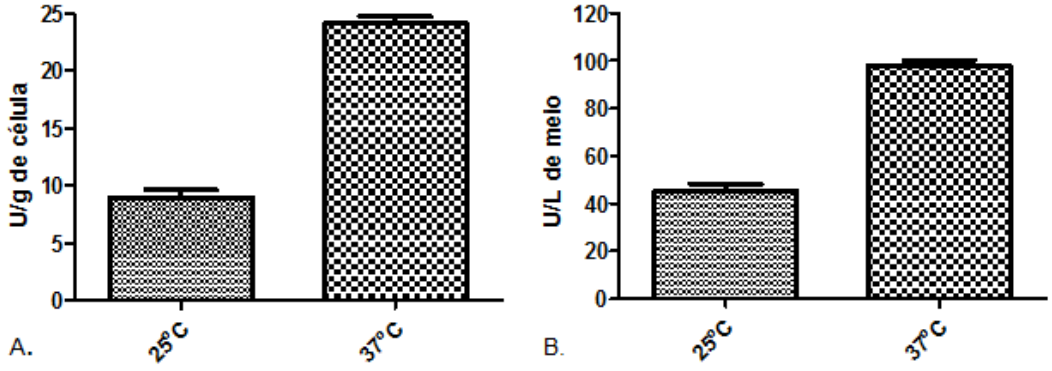


Figura 26. Média da produtividade específica (A) e da produtividade volumétrica (B) de acordo com a temperatura de indução para o mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*).

A concentração do indutor também afeta a expressão da proteína. A baixa concentração do indutor pode resultar em uma indução ineficiente e por outro lado, os indutores adicionados em excesso podem resultar em efeitos tóxicos, incluindo crescimento celular reduzido e, finalmente, redução da concentração de proteína recombinante (RAMIREZ et al. 1994; SHAFIEE et al. 2017). Nesse trabalho foi possível verificar que a concentração do indutor afetou os valores obtidos de atividade específica, principalmente no caso de temperaturas mais baixas.

Conforme mostrado na Figura 27, também foi possível visualizar grupos de experimentos cujos resultados foram muito semelhantes. Primeiramente pode-se verificar que as condições 1 e 2 proporcionaram, em média, valores mais baixos que as condições 4 e 5: 95,0 ± 3,9 U/mg e 148,0 ± 23,1 U/mg, respectivamente. Nesse caso, concentrações de indutores mais altos contribuíram para valores mais altos de atividade específica. Ao analisar as condições 7, 8, 10 e 11, as quais todas elas foram submetidas à temperatura de indução de 37ºC, os valores de atividade específica obtidos não apresentaram diferença significativa, sendo o valor médio de 282,0 ± 10,9 U/mg, quase o dobro do maior valor de atividade encontrado nas condições 4 e 5 (148,0 ± 23,1 U/mg), e aproximadamente 3 vezes maior do que valor de atividade encontrado nas condições 1 e 2 (95,0 ± 3,9 U/mg). Nesse trabalho, a temperatura de indução de 37ºC apresentou os melhores resultados, assim como verificado em outros

trabalhos (ASHAYERI-PANAH et al. 2017; SHAFIEE et al. 2017; SOLEYMAN et al. 2016; MALIK et al. 2016).

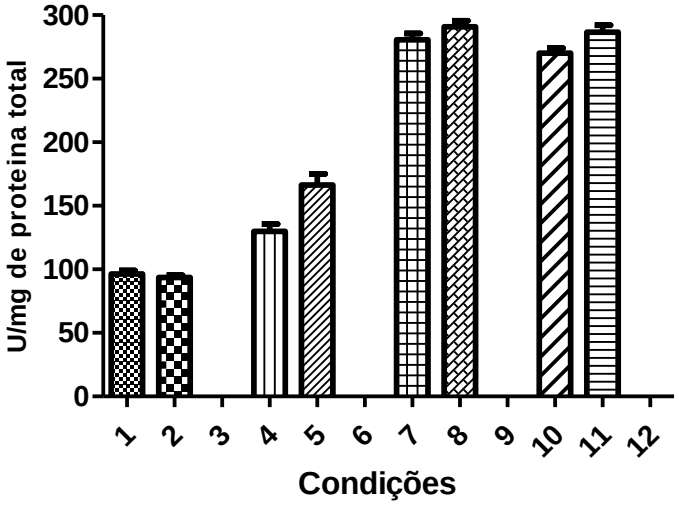


Figura 27. Atividade específica (U/mg de proteína total) das condições avaliadas (vide Tabela 3) para o mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*).

As condições de cultivo celular e indução afetam o nível secretor de enzimas extracelulares de *E. coli* (BEIGI et al. 2012; NIRASAWA et al. 1999; LEE et al. 2005), sendo a temperatura um dos parâmetros importantes associados à expressão da proteína recombinante (PENG et al. 2004). De acordo com os resultados obtidos, a temperatura foi o parâmetro que mais afetou a produtividade (específica e volumétrica) e a atividade específica do mutante 9-5F (*E. coli BL21(DE3)*).

WU et al. 2017, ao estudarem otimização da produção de *Sortase A* em *E. coli* BL21 (DE3) com diversos tempos de indução (4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas), conseguiram a melhor atividade especifica no menor tempo (4 horas). O mesmo foi verificado nesse trabalho, em que as condições com tempos mais curtos (3 horas) proporcionaram os mesmos resultados que tempos mais longos (6 horas), e, portanto é recomendável a utilização do menor tempo possível para a otimização de produção.

A concentração de indutor também demostrou que concentrações menores (0,4 mM de IPTG) reproduziram os mesmos resultados que concentrações mais elevadas (0,8 mM de IPTG) e, portanto não se justifica a

utilização de concentrações maiores. Resultados parecidos também foram verificados por MALIK et al. 2016, em que o nível de expressão da proteína recombinante de cHSPA6 na fração solúvel de *E. coli* foi muito semelhante nas concentrações de IPTG entre 0,1 e 1mM.

Dessa forma, a partir dos parâmetros testados, foi possível concluir que a melhor condição para a produção da ErA, em agitador metabólico foi:

- crescimento celular em meio de cultivo LB,
- velocidade de agitação: 180 rpm,
- tempo de indução: 3 horas
- temperatura de indução: 37ºC
- concentração de indutor: 0,4 mM de IPTG.

4.10. Construção da ErA de tamanho reduzido

As regiões imunogênicas de L-ASNases derivadas de diferentes origens tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores. RAMYA & PULICHERLA (2015) identificaram e compararam, *in silico*, regiões imunogênicas de oito L-ASNases, dentre elas a EcA, utilizada terapeuticamente. FERNANDEZ et al. (2014), também estudou a região mais imunogênica da EcA e a identificou entre os resíduos 212 e 231, isto é, a região C-terminal. Considerando estudos realizados em L-ASNases derivadas de diferentes organismos, e de acordo com as análises *in silico* descritas no item 3.5.5 e realizadas nesse trabalho, verificou-se que a região C-terminal da ErA também é a mais imunogênica e desordenada. Dessa forma, a construção de uma enzima reduzida de ErA foi planejada a partir da retirada da região C-terminal da enzima.

A construção foi realizada com a inserção de um “stop códon” em um resíduo na região do *looping* que separa a porção N-terminal da C-terminal. A Figura 28 indica a região em que o stop códon foi incluído, por meio de mutação sítio-dirigida. Foi realizado o sequenciamento genético, que confirmou o sucesso da mutação. A análise e caracterização da enzima de tamanho reduzido será o objetivo do projeto de iniciação científica do aluno Seunghag Lee.

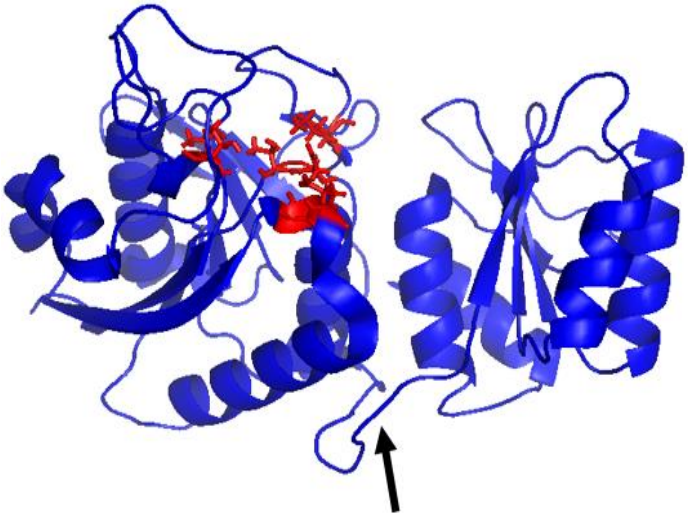


Figura 28. Modelo estrutural cristalográfico do monômero de ErA. O sítio ativo mediado pelos resíduos Thr15, Glu63, Asp96, Ser62, Thr95, Ala120 e Lys168 estão destacados em vermelho, e a proposta de mutação levando à criação de uma proteína truncada com estrutura mínima está indicada com uma seta preta, que corresponde ao *loop* conector entre a região N- e C-terminal. A figura foi criada a partir de estrutura 1O7J do PDB utilizando o software PyMOL.

5. CONCLUSÕES

A criação de uma biblioteca de mutantes foi realizada com êxito por meio da utilização da PCR propensa a erros, e dessa biblioteca foram obtidos 17 mutantes para produção de diferentes proteoformas de ErA. O mutante selecionado, nomeado de 9-5F *E. coli BL21(DE3)*), apresentou atividade específica glutaminásica reduzida pela metade, quando comparada a enzima selvagem. De acordo com os testes realizados nesse trabalho, a temperatura foi o parâmetro que demonstrou maior influência sob a produção da enzima mutante, seguido da concentração de indutor.

6. PERSPECTIVAS

Com a obtenção de uma enzima mutante com uma característica melhorada em relação à enzima selvagem, se faz necessário o estudo de outras

características, como o comportamento enzimático com relação à citotoxicidade, inicialmente com testes *in vitro*, e posteriormente *in vivo* caso os resultados obtidos sejam promissores. Para a enzima 9-6D que apresentou diminuição de parâmetros imunogênicos *in silico,* faz-se necessária a obtenção de dados experimentais *in vitro* e *in vivo* para corroborar as predições obtidas nesse trabalho. Além disso, testar comparativamente as taxas de citotoxicidade das diferentes mutantes obtidas com a enzima selvagem pode trazer dados esclarecedores com relação à controversa atividade glutaminásica.

REFERÊNCIAS

AGILENT TECHNOLOGIES. **GeneMorph II Randon Mutagenesis Kit - Instruction Manual**. Catalog #200550. 2014.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula.** Porto Alegre: Artes Médicas, p. 549-551, 2006.

ANSORGE-SCHUMACHER, M.B. et al. Directed evolution of formate dehydrogenase from Candida boidinii for improved stability during entrapment in polyacrylamide. **FEBS Journal**, v. 273, p. 3.938-3.945, 2006.

ASHAYERI-PANAH, M., et al. Cloning, optimization of induction conditions and purification of Mycobacterium tuberculosis Rv1733c protein expressed in Escherichia coli. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 9(2), p. 64-73, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUÍMICA FINA, BIOTECNOLOGIA E SUAS ESPECIALIDADES – ABIFINA. **Biotecnologia e inovação**, Facto, Ed. 35, Jan.-Fev.-Mar., 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUÍMICA FINA, BIOTECNOLOGIA E SUAS ESPECIALIDADES – ABIFINA. **Biotecnologia Farmacêutica. O que falta para o Brasil gerar inovações?**, Facto, Ed. 41, Jul.-Ago.-Set.,p. 10-15, 2014.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley, p. 4.755, 2003.

AVRAMIS, V.I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer Res,** v. 32, p. 2.423-2.437, 2012.

ÅKESSON, M.; HAGANDER, P.; AXELSSON, J. P. Probing control of fed-batch cultivations: analysis and tuning. **Control Engineering Practice**, v. 9, n. 7, p. 709-723, 2001.

BALCÃO, V. M. et al. Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multisubunit immobilization onto highly activated supports. **Biotechnol Progress**, v.17, p. 337-342, 2001.

BEIGI, L. et al. Optimization of an extracellular zinc-metalloprotease (SVP2) expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) using response surface methodology. **Protein Expression and Purification,** v. 84, p. 161-166, 2012.

BERKMEN, M. Production of disulfide-bonded proteins in Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 82, ed. 1, p. 240-251, 2012.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248–254, 1976.

BURKE, M. J. How to manage asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leucemia. **Future Oncol.,** v. 10(16), p. 2.615-27, 2014.

CAMARERO, S. et al. Engineering Platforms for Directed Evolution of Laccase from Pycnoporus cinnabarinus. **Applied and Environmental Microbiology,** p. 1.370-1.384, 2012.

CANAL FIOCRUZ – Disponível em: http://www.canal.fiocruz.br/destaque/index.php?id=1430. Acesso em 16 Jan. 2017.

CHEN, S-H. Asparaginase Therapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Focus on the Mode of Drug Resistance, **Pediatrics and Neonatology**, v. 56, p. 287 – 293, 2015.

CORTIJO-CASCAJARES, S. et al. Review of hypersensitivity reactions to antineoplastic agents. **Farm. Hosp**., v. 36(3), p. 148-158, 2012.

COSTA, I. M. et al. Recombinant L-Asparaginase 1 from Saccharomyces Cerevisiae: An Allosteric Enzyme with Antineoplastic Activity. **Scientific Reports**, 2016. Disponível em: http://doi.org/10.1038/srep36239. Acesso em 4 Dez 2017.

CURLESS, C. et al. Effect of preinduction specific growth rate on recombinant alpha consensus interferon synthesis in Escherichia coli. **Biotechnology progress**, v. 6, n. 2, p. 149-152, 1990.

DAUGHERTY, P. S. et al. Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97(5), p. 2.029-2.034, 2000.

DE MARCO, A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in Escherichia coli. **Microbial Cell Factories**, 2009. Disponível em: http://doi.org/10.1186/1475-2859-8-26. Acesso em 4 Dez 2017.

DOUER, D. Is asparaginase a critical component in the treatment of acute lymphoblastic leukemia? **Best Pract. Res. Clin. Haem**., v. 21(4), p. 647-658, 2008.

DUNLOP, C. et al. Characterization of two forms of asparaginase in Saccharomyces cerevisiae, **J. Biol. Chem**, v. 253, p. 1.297-1.304, 1978.

EGLER, R. A. et al. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 7(2), p. 62-71, 2016.

EMADI, A. et al. Asparaginase Erwinia chrysanthemi effectively depletes plasma glutamine in adult patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia. **Cancer Chemother Pharmacol**, 2018. Disponível em https://doi.org/10.1007/s00280-017-3459-6. Acesso em 15 Jan 2018.

EL-NAGGAR, N.E.-A. et al. Optimization of Culture Conditions for Production of the Anti-Leukemic Glutaminase Free L-Asparaginase by Newly Isolated Streptomyces olivaceus NEAE-119 Using Response Surface Methodology. **BioMed Research International**, 2015. Disponível em: http://doi.org/10.1155/2015/627031. Acesso 4 Dez 2017.

EMBRAPA. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**, 1999. Disponível em: http://www.cnpab.embrapa.br/ system/ files/downloads /doc110.pdf. Acesso em: 12 Dez 2016.

FAN, X. & KURGAN, L. Accurate prediction of disorder in protein chains with a comprehensive and empirically designed consensus. **J Biomol Struct**. v. 32(3), p. 448-64, 2014.

GERVAIS, D. et al. Recombinant Deamidated Mutants of Erwinia chrysanthemi L-Asparaginase Have Similar or Increased Activity Compared to Wild-Type Enzyme. **Mol Biotechnol**., v. 56, p. 865-877, 2014.

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

HAMERCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **J Pediatr (Rio J)**, v. 84, p. 52-57, 2008.

IMADA, A. et al. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, 76, 85–99, 1973.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL) – INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: Inca, p. 128, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL) - INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. INCA, p. 45, 2015. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf. Acesso em: 26 Jan 2017.

JORNAL FOLHA DE S. PAULO – Disponível em: www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/1216554-remedio-para-leucemia-aguda-so-tem-estoque-para-seis-meses.shtml. Acesso em: 18 Jan 2013.

KIMURA, M. et al. Functional Properties of Mouse Chitotriosidase Expressed in the Periplasmic Space of Escherichia coli. **PLOS ONE**. 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164367 . Acesso em: 10 Jan 2018.

KHAN, M. A. et al. Production enhancement and refolding of caprine growth hormone expressed in Escherichia coli**. Protein Expression and Purification**, v. 68, p. 85-89, 2009.

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

KOTZIA, G. A. & LABROU, N. E. L-Asparaginase from Erwinia chrysanthemi 3937: cloning expression and characterization. **Journal Biotechnology**, v. 127, p. 657–669, 2007.

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

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

LARENTIS, A.L., SAMPAIO, H.C.C., MARTINS, O.B. et al. Influence of induction conditions on the expression of carbazole dioxygenase components (CarAa, CarAc, and CarAd) from Pseudomonas stutzeri in recombinant Escherichia coli using experimental design. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 38(8), p.1045-54, 2011.

LEE, D.H. et al. Effect of culture conditions on production of 5-aminolevulinic acid by recombinant Escherichia coli, **Biosci. Biotechnol. Biochem,** v. 69, p. 470-476, 2005.

LI, P. et al. Heterologous expression, purification, and characterization of cytochrome P450sca-2 and mutants with improved solubility in Escherichia coli**. Protein Expression and Purification,** v. 65, p. 196-203, 2009.

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

MALIK, A. et al. Optimization of expression and purification of HSPA6 protein from Camelus dromedarius in *E. coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23(3), p. 410–419, 2016.

MEHTA, R. K et al. Mutations in Subunit Interface and B-Cell Epitopes Improve Antileukemic Activities of Escherichia Coli Asparaginase-II: EVALUATION OF IMMUNOGENICITY IN MICE. **The Journal of Biological Chemistry** v.289, p. 3555–3570. 2014.

MOOLA, Z. B. et al. Erwinia chrysanthemi L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. **Biochemical Journal**, v. 302, p. 921–927, 1994.

NARTA, U. K. et al. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 61 (3), p. 208 – 221, 2007

NARAZAKI, H. et al. Delayed-type hypersensitivity in response to L-asparaginase in a case of acute lymphoblastic leukemia. **J Nippon Med Sch**., v. 79(6), p. 489-493, 2012.

NESTEROVA, T. B. et al. Characterization of the Genomic Xist Locus in Rodents Reveals Conservation of Overall Gene Structure and Tandem Repeats but Rapid Evolution of Unique Sequence. **Genome Research**, v.11(5), p. 833–849, 2001.

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

NIRASAWA, S. et al. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the extracellular endoprotease of Aeromonas caviae T-64, a pro-aminopeptidase processing enzyme, **Biochim. Biophys. Acta**, v.1433, p. 335-342, 1999.

NGUYEN, H. A., SU, Y. & LAVIE, A. Structural Insight into Substrate Selectivity of Erwinia Chrysanthemil-Asparaginase. **Biochemistry**, v. 55, p. 1246–1253, 2016.

NIKAIDO, H. The Limitations of LB Medium. **Methodology, Physiology & Genetics, Teachers Corner**, 2009. Disponível em: http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009/11/the-limitations-of-lb-medium.html. Acesso em 15 Jan 2018.

NOMME, J. et al. Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. **Biochemistry**, v. 28; 51(34), p. 6.816-6.826, 2012.

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

OBREQUE, K. M. T. Desenvolvimento de L-asparaginase peguilada de E. chrysanthemi para o tratamento de leucemias. 2017. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico-Farmacêutica)** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9135/tde-10082017-114052/>. Acesso em: 2018-01-15.

OETTGEN, H. et al. Toxicity of E. coli L-asparaginase in man. **Cancer**, p. 25; 253-278, 1970.

PATEL, N. et al. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug l-asparaginase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n.7, p. 1.964-1.973, 2009.

PARMENTIERA, J. H. et al. Glutaminase activity determines cytotoxicity of l-asparaginases onmost leukemia cell lines. **Leukemia Research**, v. 39, p. 757-762, 2015.

PENG, L. et al. High-level expression of soluble human β-defensin-2 in Escherichia coli. **Process Biochemistry**, v. 39 (12), p. 2199–2205, 2004.

PENG, Z. & KURGAN, L. On the complementarity of the consensus-based disorder prediction. **Pac Symp Biocomput. 2012**, p. 176-187, 2012.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer**, v. 117, p. 238-249, 2011.

PRADHAN, B. et al. Screening and Characterization of Extracelluar L-Asparaginase Producing Bacillus Subtilis Strain hswx88, Isolated from Taptapani Hotspring of Odisha, India.” **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v.3(12), p. 936–941, 2013.

PROMEGA. **T4 DNA Ligase Uasge Information**. Part# 9PIM180, 2016.

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

RAETZ, E.A. & SALZER, M.D. Tolerability and Efficacy of L-Asparaginase Therapy in Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 32(7), p. 554-563, 2010.

RAMIREZ, O. et al. Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E. coli* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 197–206, 1994.

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

RAMYA, L.N. & PULICHERLA, K.K. Studies on Deimmunization of Antileukaemic L-Asparaginase to have Reduced Clinical Immunogenicity- An in silico Approach. **Pathol. Oncol. Res**., v.21, p. 909-920, 2015.

RASILA, T. S.; PAJUNEN, M. I.; SAVILAHTI, H. Critical evaluation of random mutagenesis by error-prone polymerase chainreaction protocols, Escherichia coli mutator strain, and hydroxylamine treatment. **Anal. Biochem**., v. 388, p. 71-80, 2009.

RENIERS, D.; ORR, C.; GIBSON, P. IV Administration of Erwinia-Derived Asparaginase in Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: Single-Centre Case Series. **The Canadian Journal of Hospital Pharmacy**, 68(6), p. 481-484, 2015.

RIZZARI, C. et al. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Oncol**., v. 25(1), p. 1-9, 2013.

ROMANO, D. et al. Optimization of human D-amino acid oxidase expression in *Escherichia coli.* **Protein Expression and Purification**, v. 68, I 1, p. 72-78, 2009.

ROMERO P. et al. Sequence complexity of disordered protein. **Structure, Function, and Bioinformatics**. v 42, p. 38–48, 2001.

SALLAN, SE. et al. More is better! Update of Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital childhood acute lymphoblastic leukemia trials. **Haematol Blood Transfus,** v. 33: p. 459-466, 1990.

SCHLEGEL, S. et al. Optimizing heterologous protein production in the periplasm of E. coli by regulating gene expression levels. **Microbial Cell Factories,** 2013. Disponível em: http://doi.org/10.1186/1475-2859-12-24. Acesso em 4 Dez 2017.

SCHMIDT, F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 4, p. 425-435, 2005.

SEZONOV, G. et al.. Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8.746-8.749, 2007.

SHAFIEE, F. et al. Optimization of the Expression of DT386-BR2 Fusion Protein in Escherichia coli using Response Surface Methodology. **Advanced Biomedical Research**, 2017. Disponível em http://doi.org/10.4103/2277-9175.201334. Acesso em: 11 Jan 2018.

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

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

SOLEYMAN, M.R. et al. High-level Expression and Purification of Active Human FGF-2 in Escherichia coli by Codon and Culture Condition Optimization. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, 2016. Disponível em: http://doi.org/10.5812/ircmj.21615. Acesso em 4 Dez 2017.

SONG, P. et al. The role of autophagy in asparaginase-induced immune suppression of macrophages. **Cell Death & Disease**, 2017. Disponível em: http://doi.org/10.1038/cddis.2017.144. Acesso em: 15 Jan 2018.

SOUZA, CA. O que está ocorrendo com o suprimento de drogas oncológicas no Brasil e no mundo. **Rev. Bras. Hemat. Hemoter.**, v. 34, editorial, 2012.

SUDHIR, A. P. et al. Characterization of a Recombinant Glutaminase-Free l-Asparaginase (ansA3) Enzyme with High Catalytic Activity from Bacillus licheniformis. **Appl Biochem Biotechnol** . v.174, p. 2504–2515, 2014.

SWALLEY S.E. et al. Screening factors effecting a response in soluble protein expression: formalized approach using design of experiments. **Anal Biochem**. v. 351(1), p. 122-7, 2006.

TAN, F. et al. Using global transcription machinery engineering (gTME) to improve ethanol tolerance of Zymomonas mobilis. **Microbial Cell Factories**, 2016. Disponível em: http://doi.org/10.1186/s12934-015-0398-y. Acesso em: 8 Jan 2018.

VINCENTELLI R., et al. High-throughput protein expression screening and purification in Escherichia coli. **Methods**, v. 55, p. 65– 72, 2011.

VOLONTÈ, F. et al. Optimization of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase expression in *E. coli.* **Protein Expression and Purification,** v. 61, p. 131-137, 2008.

VROOMAN, L. M. et al. Activity and Toxicity of Intravenous Erwinia Asparaginase Following Allergy to E. coli-Derived Asparaginase in Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 63(2), p. 228–233, 2016.

WONG, T. S. et al. A Statistical Analysis of Random Mutagenesis Methods Used for Directed Protein Evolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 355(4), p. 858-871, 2006.

WU, Z. et al. Efficient expression of sortase A from Staphylococcus aureus in Escherichia coli and its enzymatic characterizations. **Bioresources and Bioprocessing**, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s40643-017-0143-y. Acesso em: 15 Jan 2018.

YU, H. et al. Improving the thermostability of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase by error-prone PCR. **Appl Microbiol Biotechnol**., v. 82, p. 279-285, 2009.

ZHANG, L. et al. Archaeal DNA polymerases in biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00253-015-6781-0. Acesso em 04 Jan 2018.

ANEXO 1. APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

Of.CIBio/0202016/FCF

São Paulo, 13 de setembro de 2016

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 no dia 17 de agosto p.p., o Projeto **"Caracterização de L-Asparaginase de *Erwinia chrisanthemi* melhorada por evolução sintética de proteínas e otimização das condições de produção"** foi aprovado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. MARIO HIROYUKI HIRATA
Presidente da CIBio

Ilma. Sra.
Profa. Dra. GISELE MONTEIRO DE SOUZA
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/fax: (011) 3091-3678 - e-mail: atadfcf.usp.br

ANEXO 2. FICHA DO ALUNO

15/01/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9134 - 5154404/1 - Débora Fernandes Custodio

Email:	debora.custodio@usp.br
Data de Nascimento:	24/06/1985
Cédula de Identidade:	RG - 35.226.744-6 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutica-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2011
Curso:	Doutorado Direto
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula:	03/02/2014
Início da Contagem de Prazo:	03/02/2014
Data Limite para o Depósito:	05/02/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Gisele Monteiro de Souza - 03/02/2014 até o presente. Email: smgisele@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Adalberto Pessoa Junior - 03/02/2016 até o presente. Email: pessoajr@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 03/02/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 01/03/2016
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 03/02/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017
Impresso em: 15/01/2018 14:25:38

15/01/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 5154404/1 - Débora Fernandes Custodio

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5733-5/6	Uso Industrial de Enzimas	03/02/2014	06/04/2014	90	6	100	A	N	Concluída
QBQ5802-4/2	Metodologias em Bioquímica e Biologia Molecular: Conceitos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	21/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5731-1/1	Ferramentas de Bioinformática para Análise de Estruturas de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	05/05/2014	15/06/2014	60	4	100	B	N	Concluída
FBT5773-7/4	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	04/08/2014	12/10/2014	30	2	100	A	N	Concluída
ODO5700-1/1	Docência Universitária e Estratégias de Ensino-Aprendizagem (Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo)	04/08/2014	24/11/2014	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada
AGG5900-12/3	Preparação Pedagógica (Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas - Universidade de São Paulo)	12/08/2014	24/11/2014	15	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MPT5760-4/4	Metodologia de Ensino I: Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	15/08/2014	16/10/2014	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5709-6/2	Ensaios Pedagógicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/11/2014	07/12/2014	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5700-3/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/05/2015	09/07/2015	90	6	100	A	N	Concluída

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

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 15/01/2018 14:25:38

15/01/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 5154404/1 - Débora Fernandes Custodio

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
3435230	Gisele Monteiro de Souza	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017
Impresso em: 15/01/2018 14:25:38