

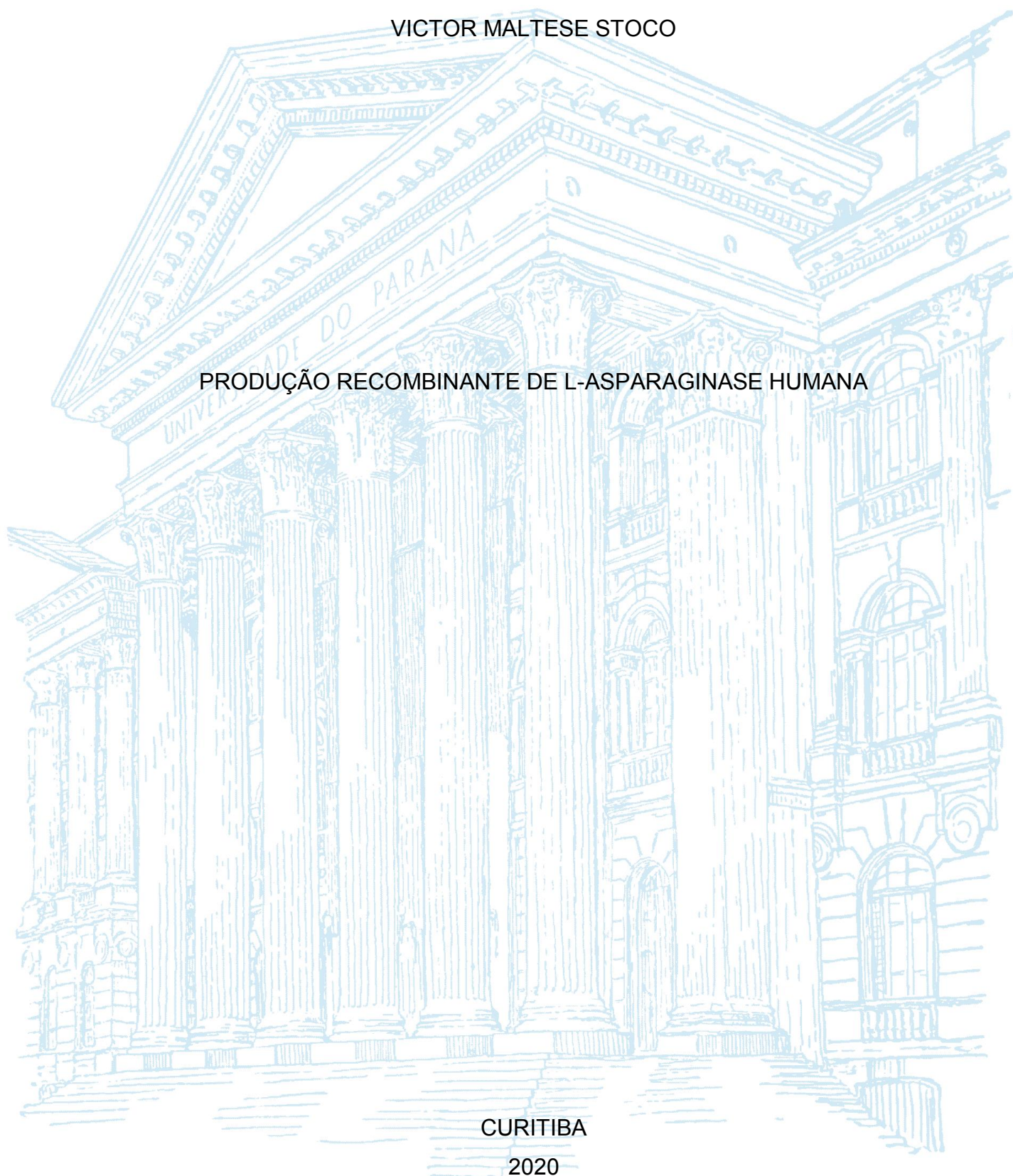
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VICTOR MALTESE STOCO

PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE L-ASPARAGINASE HUMANA

CURITIBA

2020



VICTOR MALTESE STOCO

PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE L-ASPARAGINASE HUMANA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Berenice R. Steffens

Co-orientadoras: Dra. Tatiana A. C. Brasil de Souza

MSc. Stephanie Bath de Moraes

CURITIBA

2020

TERMO DE APROVAÇÃO

VICTOR MALTESE STOCO

PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE L-ASPARAGINASE HUMANA

Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II) apresentado ao curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná, como requisito necessário à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina à banca avaliadora.

Profa. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens

Orientadora - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Dra. Juliana de Saldanha da Gama Fischer Carvalho

ICC - Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR

Curitiba, ____ de _____ de 2020.

AGRADECIMENTOS

À minha família. Mesmo longe, vocês me possibilitaram estar onde estou. Obrigado por tudo. Eu amo vocês.

Às minhas orientadoras, Tatiana e Stephanie, por me abrirem a possibilidade de trabalhar num projeto tão nobre. Contribuir com parte de algo que vai impactar diretamente em pacientes com leucemia me inspira. Obrigado por me guiarem nessa reta final da graduação. Obrigado por toda a paciência para me ensinarem.

À professora Maria Berenice Steffens, por se dispor a me ajudar nesta etapa importante da graduação.

Aos meus colegas do Laboratório de Proteômica Estrutural e Computacional por me acolherem tão bem no nosso laboratório. O apoio e a companhia de vocês tornam o trabalho mais prazeroso.

A todos os meus ex-orientadores, mestrandas e doutorandas que já acompanhei, por terem contribuído para a construção do meu conhecimento científico. Obrigado por me darem oportunidades de me aprimorar um pouco mais na ciência. Graças a vocês, aprendi um pouco de cada área das ciências biomédicas que me envolvi e trago seus ensinamentos até hoje.

A todos meus amigos que me apoiaram nessa reta final da graduação a tomar a decisão que fosse certa para mim (em especial, Isabella, Giovanna e Matheus). Ao meu amigo Rodrigo pelo empurrão final nesse TCC.

À Fundação Araucária e à Fiocruz que, mesmo frente aos percalços enfrentados pela ciência brasileira, provêm financiamento e estrutura de ponta para o desenvolvimento da ciência nacional.

À Universidade Federal do Paraná, por ter me oferecido um universo de possibilidades durante a graduação. Fazer parte desta instituição mudou minha vida completamente e me fez crescer de tantas formas.

Ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná. Seu corpo docente fundou a base do conhecimento que eu buscava desde que entrei no curso.

“Definir é matar. Sugerir é criar.”

- Mallarmé

RESUMO

L-asparaginase é uma enzima utilizada desde a década de 70 no tratamento de leucemia linfóide aguda. Sua atividade catalítica sobre L-asparagina depleta este aminoácido não-essencial do sangue, privando células cancerosas de utilizá-lo na síntese proteica. Células leucêmicas são deficientes na produção independente de L-asparagina, portanto devem captá-la da fonte sérica para sobreviverem. Atualmente, L-asparaginases utilizadas no tratamento de leucemia são de origem bacteriana, gerando efeitos tóxicos e imunogênicos nos pacientes. Uma alternativa para sua substituição seria usar L-asparaginase humana (hASRGL1) na clínica, uma vez que ela tem potencial para diminuir os efeitos adversos do tratamento. No entanto, seu uso farmacológico ainda é restrito devido a sua baixa atividade catalítica *in vitro*, já que essa enzima depende de uma autoclivagem em sua estrutura para ser ativada, sendo esse um processo limitado *in vitro*. Até o momento, a produção recombinante de hASRGL1 processada não ultrapassa 50% do total de enzima produzida, encarecendo o processo de produção e dificultando seu uso na clínica. Nesse sentido, esse trabalho propôs desenvolver um protocolo de produção de hASRGL1 por métodos recombinantes com o intuito de oportunizar tanto a produção em escala industrial quanto a caracterização estrutural e funcional desta enzima. Para isso, foram utilizadas técnicas de expressão heteróloga de proteínas em *Escherichia coli* e purificação por métodos cromatográficos a partir das frações solúvel e insolúvel do lisado celular para obtenção de hASRGL1. A purificação utilizando a fração solúvel do lisado celular apresentou o dobro do rendimento de hASRGL1 (0,56 mg/L de expressão) do que o protocolo utilizando a fração insolúvel (0,26 mg/L de expressão), além de alta pureza de hASRGL1 (86%). Foi observado processamento de hASRGL1 utilizando a fração solúvel, um forte indício da proteína com atividade bioquímica. Este estudo abre caminho para aprimoramentos da produção recombinante de hASRGL1 e estudos estruturais e funcionais acerca desta enzima, possibilitando seu futuro uso na clínica.

Palavras-chave: L-asparaginase humana. Produção recombinante. Leucemia. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

L-asparaginase is an enzyme that has been used since the 70s to treat acute lymphoid leukemia. Its catalytic activity over L-asparagine depletes this non-essential amino acid from the blood, impairing cancer cells to use it for protein synthesis. Leukemic cells are deficient on the production of L-asparagine; thus, they depend on its intake from seric source to survive. Nowadays, L-asparaginases used on leukemia treatment come from bacterial sources, causing toxic and immunogenic adverse effects on patients. An alternative to replace them would be using the human L-asparaginase (hASRGL1) on clinic, as it has potential to diminish the adverse effects from treatment. Nonetheless, its pharmacological use is still restricted due to its low catalytic activity *in vitro*, as it depends on an autocleavage on its structure to be activated, which is a limited process *in vitro*. So far, the recombinant production of processed hASRGL1 does not exceed 50% of total produced enzyme, making the production process expensive and hampering its clinical use. In this sense, this study proposed the development of a production protocol of hASRGL1 by recombinant methods aiming to allow not only the industrial scale production but also structural and functional studies on this enzyme. To do so, techniques of heterologous protein expression and purification by chromatographic methods were used in order to obtain hASRGL1. The purification which uses the soluble fraction of the bacterial lysate had a 2-fold higher protein yield (0,56 mg/L of expression) compared to the protocol using the insoluble fraction (0,26 mg/L of expression), as well as high purity of hASRGL1 (86%). Cleavage of hASRGL1 was observed using the soluble fraction, which is a strong evidence of protein with biochemical activity. This study paves the way for hASRGL1 recombinant production improvements and structural and functional studies about this enzyme, making possible its future use in clinics.

Keywords: Human L-asparaginase. Recombinant heterologous production. Leukemia. *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema da hematopoiese em humanos.....	17
FIGURA 2 – Reação de catálise de L-asparaginase.....	18
FIGURA 3 – Estrutura tridimensional de L-asparaginase de <i>E. chrysantemi</i> e L-asparaginase II de <i>E. coli</i>	19
FIGURA 4 – Hidrólise de L-glutamina em L-glutamato.....	20
FIGURA 5 – Estrutura tridimensional de hASRGL1 processada.....	22
FIGURA 6 – Estrutura tridimensional de hASRGL1 evidenciando o loop HGG.....	23
FIGURA 7 – Oligomerizações de hASRGL1.....	24
FIGURA 8 – Perfil eletroforético teórico de dímeros de hASRGL1.....	25
FIGURA 9 – Fluxograma da produção de proteínas recombinantes.....	28
FIGURA 10 – Esquema do mecanismo da cromatografia de afinidade.....	36
FIGURA 11 – Esquema do mecanismo da cromatografia por troca iônica.....	37
FIGURA 12 – Esquema do mecanismo da SEC.....	38
FIGURA 13 – Extrato total do lisado celular em E1.....	40
FIGURA 14 – Cromatografia de afinidade de hASRGL1 em E1.....	41
FIGURA 15 – SEC de hASRGL1 em E1.....	42
FIGURA 16 – <i>Western Blot</i> e SDS-PAGE da amostra final purificada de hASGRL1 em E1.....	43
FIGURA 17 – Extrato total do lisado celular em E2.....	44
FIGURA 18 – Cromatografia de afinidade de hASRGL1 em E2.....	45
FIGURA 19 - SEC de hASRGL1 em E2.....	45
FIGURA 20 – <i>Western Blot</i> e SDS-PAGE da amostra final purificada de hASGRL1 em E2.....	46
FIGURA 21 – SDS-PAGE das etapas do renovelamento de ER1.....	47

FIGURA 22 – Cromatografia de troca aniônica de hASRGL1 em ER1.....	49
FIGURA 23 – Cromatografia de afinidade de hASRGL1 em ER1.....	49
FIGURA 24 – SDS-PAGE das etapas do renovelamento de ER2.....	50
FIGURA 25 – Cromatografia de troca aniônica de hASRGL1 em ER2.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Dosagem de proteínas das etapas do renovelamento em ER1.....	48
TABELA 2 – Dosagem de proteínas das etapas do renovelamento em ER2.....	51
TABELA 3 – Parâmetros alterados a partir de protocolos de expressão e purificação de hASRGL1 da literatura.....	53
TABELA 4 – Rendimentos de hASRGL1 obtidos no presente estudo.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Curva de calibração da coluna HiLoad Superdex 16/600.....	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CI	- Corpos de Inclusão
CV	- <i>Column Volume</i>
DLS	- <i>Dinamic Light Scattering</i>
D.O. ₆₀₀	- Densidade Óptica a 600 nm
E1	- Expressão 1 da fração solúvel do lisado celular
E2	- Expressão 2 da fração solúvel do lisado celular
ER1	- Expressão 1 da fração insolúvel do lisado celular
ER2	- Expressão 2 da fração insolúvel do lisado celular
ET	- Extrato Total do lisado celular
FPLC	- <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
FT	- <i>Flow Through</i>
G167	- Glicina na posição 167
hASRGL1	- L-asparaginase humana <i>like 1</i>
HGG	- Histidina 8 – Glicina 9 – Glicina 10
HPLC	- <i>High Precision Liquid Chromatography</i>
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
IPTG	- Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LLA	- Leucemia linfoide aguda
LPS	- Lipopolissacarídeo
MW	- <i>Molecular Weight</i>
PBS	- Tampão fosfato-salino
PEG	- Polietilenoglicol
pI	- Ponto isoelétrico
PMSF	- <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PVDF	- <i>Polyvinylidene difluoride</i>
SAXS	- <i>Small-angle X-ray Scattering</i>
SBN CI	- Sobrenadante dos Corpos de Inclusão
SDS-PAGE	- <i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	- <i>Size Exclusion Chromatography</i>
T168	- Treonina na posição 168
T _M	- Temperatura de <i>melting</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)	16
1.2. L-ASPARAGINASE	18
1.2.1. L-asparaginases bacterianas	19
1.2.2. L-asparaginase humana	21
1.2.2.1. Oligomerizações de L-asparaginase humana	23
1.2.2.2. Vantagens do uso de L-asparaginase humana na clínica	26
1.3. PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS	26
1.3.1. Expressão de proteínas em <i>E. coli</i>	27
1.3.2. Métodos de purificação de proteínas	29
2. OBJETIVOS	29
2.1. OBJETIVO GERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. JUSTIFICATIVA	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. SOLUÇÕES E TAMPÕES	30
4.2. MEIOS DE CULTURA	32
4.3. MICRO-ORGANISMOS	32
4.4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DE PROTOCOLOS DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE hASRGL1	32
4.5. GERAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE hASRGL1	32
4.6. PREPARO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES	33
4.7. EXPRESSÃO RECOMBINANTE DE hASRGL1 EM <i>E. coli</i>	33
4.7.1. Expressão de hASRGL1 a partir da fração solúvel do lisado celular	33
4.7.2. Expressão de hASRGL1 a partir da fração insolúvel do lisado celular	34
4.8. PURIFICAÇÃO DE hASRGL1 POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	35
4.8.1. Cromatografia de afinidade	35
4.8.2. Cromatografia por troca iônica	37
4.8.3. Cromatografia por exclusão de tamanho	38
4.9. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	39

4.10. <i>WESTERN BLOT</i>	39
5. RESULTADOS	39
5.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DE PROTOCOLOS DE PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE hASRGL1.....	39
5.2. PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE hASRGL1.....	40
5.2.1. Expressão 1 a partir da fração solúvel do lisado celular (E1)	40
5.2.2. Purificações a partir de E1.....	40
5.2.2.1. Cromatografia de afinidade (E1).....	40
5.2.2.2. Cromatografia por exclusão de tamanho (E1).....	41
5.2.2.3. Análise da produção em E1.....	43
5.2.3. Expressão 2 da fração solúvel do lisado celular (E2).....	44
5.2.4. Purificações a partir de E2.....	44
5.2.4.1. Cromatografia de afinidade (E2).....	44
5.2.4.2. Cromatografia por exclusão de tamanho (E2).....	45
5.2.4.3. Análise da produção em E2.....	46
5.2.5. Etapas da Expressão 1 da fração insolúvel do lisado celular (ER1).....	46
5.2.6. Purificações a partir de ER1.....	48
5.2.6.1. Cromatografia por troca aniônica (ER1).....	48
5.2.6.2. Cromatografia de afinidade (ER1).....	49
5.2.7. Etapas da Expressão 2 da fração insolúvel do lisado celular (ER2).....	50
5.2.8. Purificações a partir de ER2.....	51
5.2.8.1. Cromatografia por troca aniônica (ER2).....	51
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

Leucemias são neoplasias malignas nas quais células hematopoiéticas anormais se proliferam descontroladamente e se acumulam na medula óssea e no sangue (INCA, 2016). Dentre elas, a leucemia linfóide aguda (LLA) é a neoplasia mais comum em crianças abaixo dos 5 anos, representando cerca de 80% de todas as leucemias nessa faixa etária (COOK *et al.* 2014; HOWLADER *et al.*, 2014; METAYER *et al.*, 2013, NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2000).

No Brasil, a taxa de sobrevida de pacientes com LLA após tratamento gira em torno de 66 a 72%, podendo chegar a mais de 90% em outros países (ALLEMANI *et al.*, 2015). Esta alta taxa de sobrevida está associada à estratificação do tratamento de LLA com base no risco do paciente, sendo que pacientes de baixo risco apresentam melhor prognóstico da doença. Além disso, esta taxa se dá devido ao uso de esquemas poliquimioterápicos no tratamento contra a LLA a fim de evitar o desenvolvimento de resistência, as quais incluem uso de quimioterápicos, esteróides e uma enzima L-asparaginase (CHANG *et al.*, 2008). Esta enzima cliva o aminoácido L-asparagina em L-aspartato e amônia, depletando-o da corrente sanguínea e impedindo as células cancerosas de absorverem L-asparagina sérica. Isso prejudica a síntese proteica e consequentemente causa a morte celular das células leucêmicas (RICHARDS; KILBERG, 2006; LI *et al.*, 2006).

Desde a década de 70, L-asparaginase vem sendo utilizada para tratar a LLA, e seu uso aumentou em pelo menos 15% a sobrevida dos pacientes pós-tratamento (AMYLON *et al.*, 1999; MOGHRABI *et al.*, 2007). Atualmente, existem três L-asparaginases de origem bacteriana disponíveis comercialmente: L-asparaginase II de *Escherichia coli*, sua versão PEGuilada e L-asparaginase de *Erwinia chrysantemi* (ROTH *et al.*, 2013). Porém, o uso de L-asparaginases bacterianas apresenta diversos efeitos adversos nos pacientes, como hipersensibilidade e toxicidade (PIETERS *et al.*, 2011).

Uma alternativa para minimizar esses efeitos, na terapia contra a LLA, seria substituí-las pela L-asparaginase humana *like 1* (hASRGL1, ALP, CRASH ou hASNase), uma vez que ela tem potencial para diminuir a imunogenicidade e toxicidade do tratamento (NOMME *et al.*, 2012). No entanto, ainda não foi possível utilizar a versão humana desta enzima na terapia farmacológica devido a sua baixa

atividade catalítica *in vitro*, já que sua ativação depende de uma autoclivagem estrutural, sendo este um processo limitado *in vitro*. Atualmente, a taxa de obtenção de hASRLG1 ativa recombinante é de 50%, o que encarece o processo de produção (CANTOR *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012). Nesse sentido, este trabalho propõe desenvolver um método de produção recombinante de hASRGL1 ativa, o qual possibilitará estudos estruturais, caracterização de sua atividade biológica e avaliação de toxicidade, requisitos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Uma vez que este estudo visa a produção em escala laboratorial desta proteína, sua execução abre caminho para o escalonamento da produção de hASRGL1.

1.1. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)

Leucemias são cânceres hematológicos que afetam linhagens de células hematopoiéticas na medula óssea (FIGURA 1). O último levantamento do INCA (Instituto Nacional do Câncer) estimou em 10810 novos casos de leucemia por ano no Brasil e, para cada ano do triênio 2020-2022, 5920 casos em homens e 4890 casos em mulheres (INCA, 2020). Essas neoplasias podem ser classificadas segundo a linhagem celular afetada (mieloide ou linfoide) e seu estágio de maturação (aguda ou crônica). Quando a linhagem de células progenitoras está alterada, diz-se que a leucemia é aguda. No caso da linhagem de células maduras, chama-se a leucemia de crônica. Caso afete células imaturas da linhagem linfoide, como linfoblastos, classifica-se como leucemia linfoide, assim como chama-se de leucemia mieloide se afetarem células da linhagem mieloide, como mieloblastos.

Não se sabe a causa exata da patogênese de leucemias. Já foram descritos alguns fatores de risco como infecções virais, síndrome de Down, histórico familiar, tabagismo, radiação ionizante e algumas substâncias químicas, como o benzeno (HUTTER, 2015; NCI, 2014).

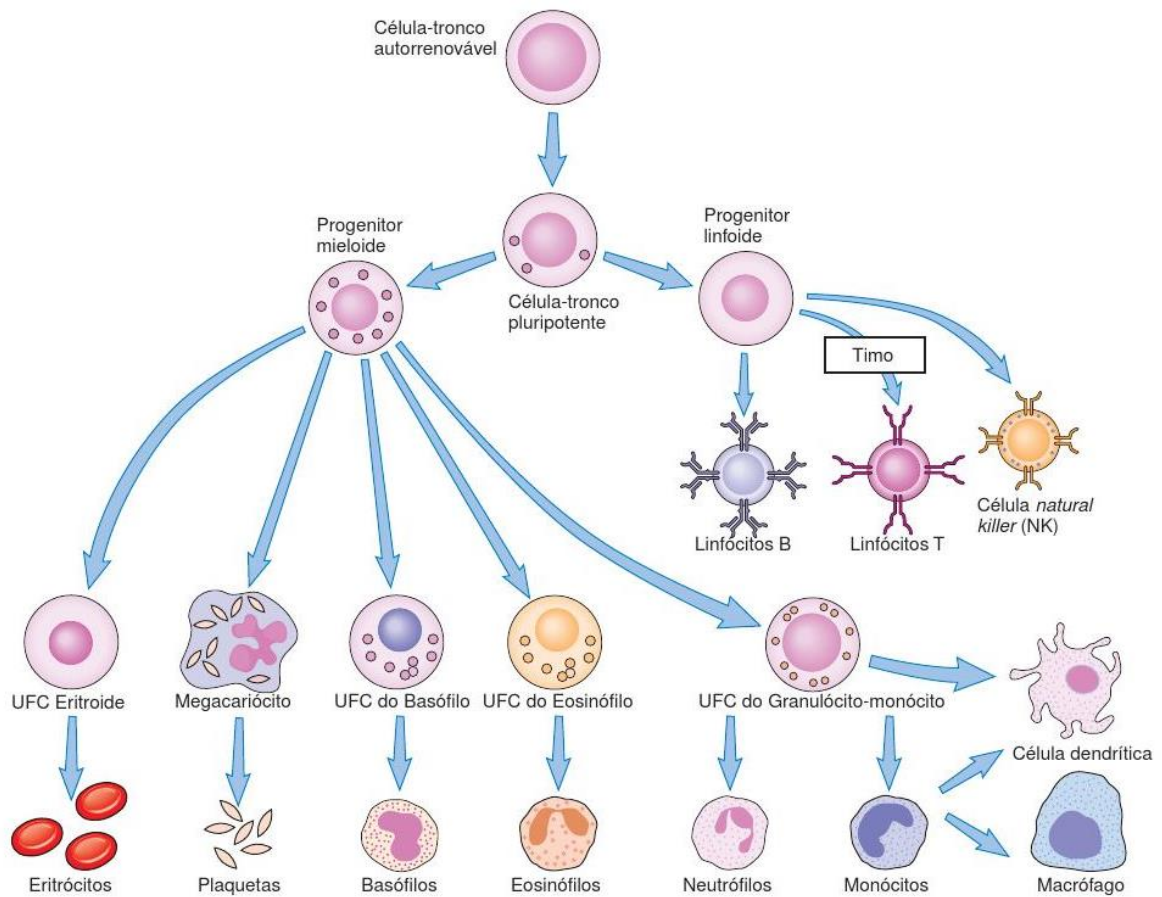


FIGURA 1: Esquema da hematopoiese em humanos.

FONTE: Adaptado de ABBAS *et al.*, 2014.

A LLA é a forma agressiva da doença que mais afeta a faixa etária abaixo de 5 anos, sendo mais comum em crianças brancas do sexo masculino. No mundo, estima-se que ocorrem cerca de 75000 novos casos de LLA por ano (PEDROSA; LINS, 2006). A sintomatologia da LLA é consequência da substituição de células sanguíneas saudáveis maduras por células neoplásicas imaturas. Em decorrência disto, impede-se o bom funcionamento do sistema imune contra infecções, causando imunossupressão nos pacientes. Outros sintomas comuns são anemia, mal-estar e fadiga, associados a quadros hemorrágicos e trombocitopênicos (CLARKE *et al.*, 2016). Com base em análises morfológicas da medula óssea e do sangue, a LLA é diagnosticada por meio de reações citoquímicas, perfil imunofenotípico e citogenético das células leucêmicas (CHIARETTI; ZINI; BASSAN, 2014).

O tratamento da LLA se dá por meio do protocolo estabelecido pelo grupo Berlin-Frankfurt-Munich, o qual é preconizado pelo Ministério da Saúde (INCA,

2001). Nele, existem três fases no tratamento: indução, consolidação e manutenção. Na indução, espera-se alcançar a remissão do paciente ao longo de cerca de três meses com uso de um coquetel de diferentes quimioterápicos, como vincristina, daunorrubicina, metotrexato, um esteroide, como prednisona, e L-asparaginase. Após esta fase do tratamento, pretende-se não encontrar células cancerosas na medula óssea. Já na consolidação, o objetivo é extinguir quaisquer resquícios submicroscópicos de células neoplásicas e, assim, impedir a recidiva da doença por meio do uso de diferentes quimioterápicos, incluindo L-asparaginase, selecionados com base no grau de risco do paciente e administrados por cerca de dois meses. A fase de manutenção ocorre quando se alcança remissão completa das células neoplásicas, podendo durar de dois a três anos com uso de quimioterápicos e esteroides (INCA, 2001; MÖRICKE *et al.*, 2008; INSTITUTO ONCOGUIA, 2015).

1.2. L-ASPARAGINASE

L-asparaginase é uma enzima que catalisa a hidrólise da L-asparagina em L-aspartato e amônia (FIGURA 2). É produzida naturalmente por uma série de organismos, como bactérias, fungos e animais, sendo parte de uma das vias de produção do aminoácido não essencial L-aspartato. Na indústria alimentícia, L-asparaginase é usada para diminuir a quantidade de acrilamida em pães e outros alimentos assados (SANGHVI *et al.*, 2016). Já na indústria farmacêutica, a enzima vem sendo utilizada desde o final da década de 70 como medicamento na terapia contra a LLA (SALZER *et al.*, 2014).

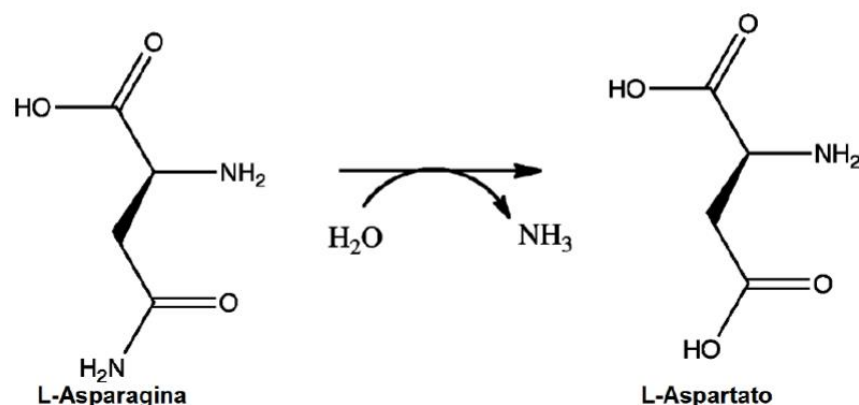


FIGURA 2: Reação de catálise de L-asparaginase.

FONTE: Extraído de WORTHINGTON ENZYME MANUAL (2016).

O uso dessa enzima para tratar LLA se dá por meio de um mecanismo de ação seletivo contra as células cancerosas. Nessa doença, estas apresentam deficiência na produção da enzima asparagina sintetase, responsável pela produção do aminoácido não-essencial L-asparagina no citosol. Frente a esta deficiência, células leucêmicas dependem da absorção de L-asparagina sérica para sobreviverem. Assim, o mecanismo de ação da L-asparaginase como medicamento, administrado via intravenosa ou intramuscular, envolve a depleção de L-asparagina sérica, impedindo a absorção de asparagina pelas células cancerosas e, por consequência, impedindo síntese proteica, o que causa a morte celular. As células normais, por sua vez, mantêm as suas funções por expressarem asparagina sintetase e, portanto, sintetizam L-asparagina *per se* (RICHARDS; KILBERG, 2006; LI *et al.*, 2006).

1.2.1. L-asparaginases bacterianas

No tratamento da LLA, são empregadas três L-asparaginases bacterianas disponíveis comercialmente: a L-asparaginase II de *E. coli* (FIGURA 3a), sua versão PEGuilada e a L-asparaginase de *E. chrysantemi* (FIGURA 3b) (ROTH *et al.*, 2013). No Brasil, a primeira escolha para tratamento é a L-asparaginase II de *E. coli*. No entanto, esta é a versão da enzima mais tóxica e imunogênica dentre as três.

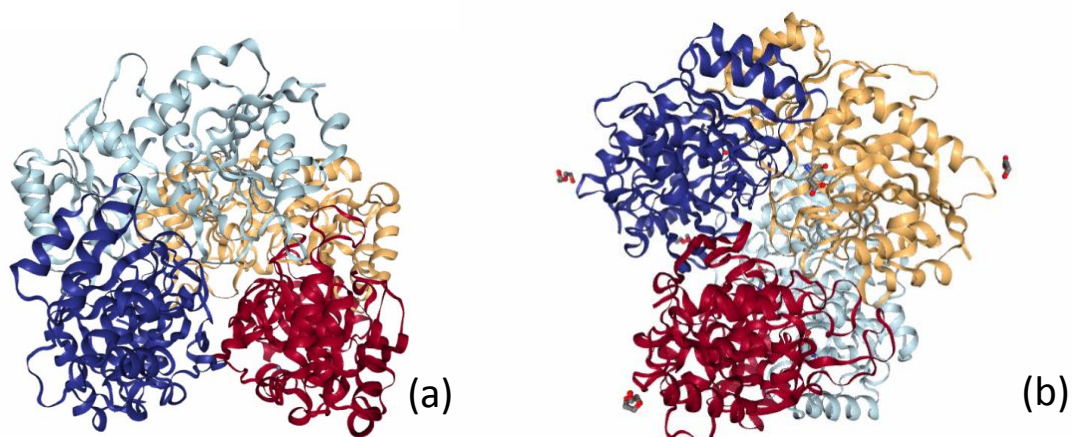


FIGURA 3: Estrutura tridimensional da unidade funcional de L-asparaginase de L-asparaginase II de *E. coli* (PDB 6EOK) (a) e *E. chrysantemi* (PDB 5F52) (b).

Cada monômero está evidenciado de uma cor. FONTE: Extraído de PDB.

A toxicidade é decorrente do fato das L-asparaginases bacterianas também possuírem atividade glutaminase (FIGURA 4). A atividade hidrolítica sobre L-glutamina gera um excesso de L-glutamato que pode causar hepatotoxicidade, pancreatite aguda, hiperglicemia, glicosúria, cetoacidose, distúrbios do sistema nervoso central, hipoalbuminemia, hipofibrinonemia, hipercoagulação, entre outras disfunções (AVRAMIS, 2012; MÜLLER; BOOS, 1998). Além disso, L-asparaginases bacterianas podem ativar o sistema imune ao serem administradas via endovenosa, causando reações de hipersensibilidade em 60% dos pacientes, e levando à inativação do medicamento nesse processo (PIETERS *et al.*, 2011; RYTTING, 2012; AVRAMIS, 2012).



FIGURA 4: Hidrólise de L-glutamina em L-glutamato.

FONTE: Adaptado de ELSHAFEI *et al.*, 2014.

No Brasil, o tratamento se dá, primeiramente, utilizando L-asparaginase II de *E. coli* e, em casos de hipersensibilidade, utiliza-se a versão PEGuilada da enzima a fim de diminuir este efeito adverso. Na presença de PEG, a L-asparaginase II é protegida de reconhecimento e degradação por sistemas de defesa do paciente, e assim aumentam sua meia vida plasmática. No entanto, além desta ser mais cara, o paciente previamente tratado com a enzima nativa pode ter desenvolvido anticorpos anti-L-asparaginase II, diminuindo a eficácia do tratamento. L-asparaginase de *E. chrysantemi* pode ser prescrita como alternativa, porém, em comparação com a L-asparaginase II de *E. coli*, possui meia vida menor e estudos relatam uma quantidade significativamente maior de pacientes que não alcançam a remissão completa das células leucêmicas (PIETERS *et al.*, 2011; RYTTING, 2012; AVRAMIS, 2012).

1.2.2. L-asparaginase humana

Uma solução para o uso de L-asparaginases bacterianas seria o uso de hASRGL1, que, assim como as L-asparaginases bacterianas, possui atividade hidrolítica sobre L-asparagina, além de clivar peptídeos isoaspartil. Proteínas podem formar peptídeos isoaspartil espontaneamente entre resíduos de L-aspartato e L-asparagina, gerando perda de função proteica e, consequentemente, sinalizando-a para proteólise (ASWAD; PARANANDI; SCHURTER, 2000). A formação equivocada destes peptídeos pode desencadear reações fisiopatológicas, aumentando susceptibilidade à proteólise ou perda de função (BÖHME *et al.*, 2008). hASRGL1 pode atuar na remoção dessa sinalização através da hidrólise de peptídeos isoaspartil, sendo importante para o correto funcionamento celular (MICHALSKA; JASKÓLSKI, 2006).

hASRGL1 é expressa principalmente no citosol de cérebro, testículos, endométrio e fígado. Sua função nesses tecidos é hidrolisar peptídeos isoaspartil e a L-asparagina. No cérebro, atua na formação de L-aspartato, neuroativador de células nervosas (CANTOR *et al.*, 2009; DIETERICH *et al.*, 2003; EVTIMOVA *et al.*, 2004). É uma proteína de 34 kDa, produzida em uma forma inativa, sendo necessária sua clivagem entre os resíduos G167 (tornando-se o C-terminal da subunidade α , pesando 22 kDa) e T168 (tornando-se o N-terminal da subunidade β , pesando 15 kDa) para ativá-la (FIGURA 5), sendo que ambas as subunidades permanecem interagindo entre si via interações fracas. Essa clivagem ocorre na ausência de proteases, sendo autocatalítica (BRANNIGAN *et al.*, 1995).

L-asparaginases bacterianas fazem parte da subfamília *bacterial type*, são ativas *per se*, uma vez que não dependem de uma autoclivagem em sua estrutura para ativação enzimática (CANTOR *et al.*, 2009). Já hASRGL1 faz parte da subfamília de proteínas *plant type*, as quais dependem do autoprocessamento para apresentarem atividade enzimática.

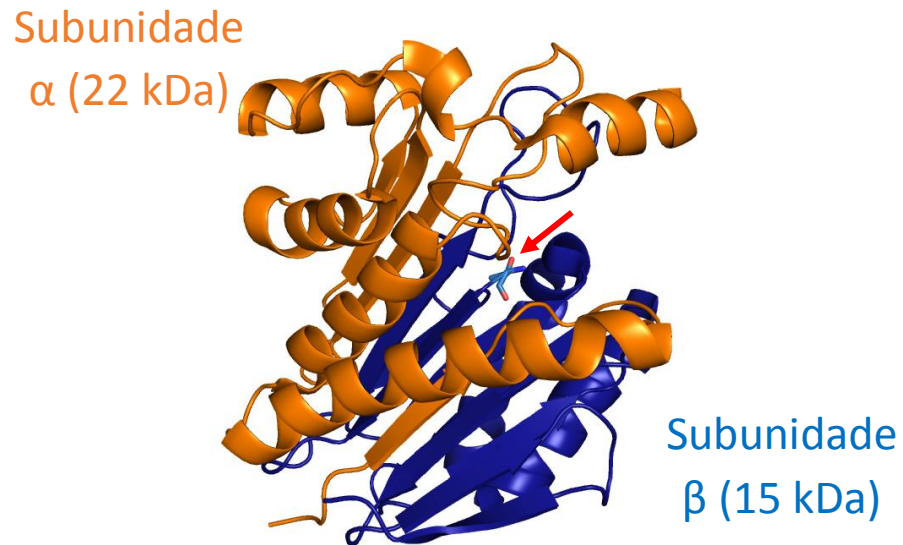


FIGURA 5: Estrutura tridimensional de L-asparaginase humana *like 1* processada. Em destaque na flecha vermelha, a T168 na porção N-terminal da subunidade β .

FONTE: O AUTOR, 2019.

O mecanismo do autoprocessamento ainda não é completamente elucidado. Porém, sabe-se que depende de mudanças conformacionais específicas na estrutura da proteína e envolve, entre outros resíduos de aminoácidos, uma sequência de resíduos denominada *loop* HGG (Histidina 8 – Glicina 9 – Glicina 10) (LI *et al.*, 2012) (FIGURA 6). Em conformação aberta, o *loop* HGG possibilita a interação de resíduos que levam à clivagem da ligação peptídica entre G167 e T168. Isso faz com que a α -amina de T168 que participava da ligação peptídica esteja livre para atacar a L-asparagina e, assim, clivá-la. Portanto, o autoprocessamento é essencial para a atividade catalítica de hASRGL1 (MORAIS, 2017). No entanto, ainda não se sabe como esse processo ocorre fisiologicamente, nem se há algum sinal no citosol para o desencadeamento do autoprocessamento de hASRGL1.



FIGURA 6: Estrutura tridimensional da L-asparaginase humana *like 1* evidenciando o *loop* Histidina 8-Glicina 9-Glicina 10. A flecha laranja indica o *loop* HGG, que também é destacado em amarelo.

FONTE: O AUTOR, 2019.

1.2.2.1. Oligomerizações de L-asparaginase humana

Sabe-se que hASRGL1 apresenta diferentes oligomerizações, dependendo do estado oxidativo da proteína (reduzido ou oxidado). Em relação ao processamento de oligômeros já foram identificadas três categorias de hASRGL1: processada, semi-processada e não-processada (LI *et al.*, 2016). Acredita-se que a formação de dímeros e trímeros reduzidos é feita por intermédio de ponte dissulfeto entre resíduos de cisteínas das subunidades α de hASGRL1 (MORAIS, 2017). Já em dímeros oxidados, a estrutura oligomérica é mantida por intermédio de ligações fracas entre os monômeros de hASRGL1 (LI *et al.*, 2016).

Na forma processada, hASGRL1 sofreu autoprocessamento. Pode ser encontrada como monômero processado, dímero processado reduzido e dímero processado oxidado (FIGURA 7a). Na forma semi-processada dimérica, um dos monômeros de hASRGL1 sofreu autoprocessamento, enquanto o outro não sofreu. Pode ser encontrada como dímero semi-processado oxidado e dímero semi-processado reduzido (FIGURA 7b). Por fim, na forma não-processada, hASRGL1 não

sofreu autoprocessamento. Existe nas formas de monômero não-processado, dímero não-processado reduzido e dímero não-processado oxidado (FIGURA 7c).

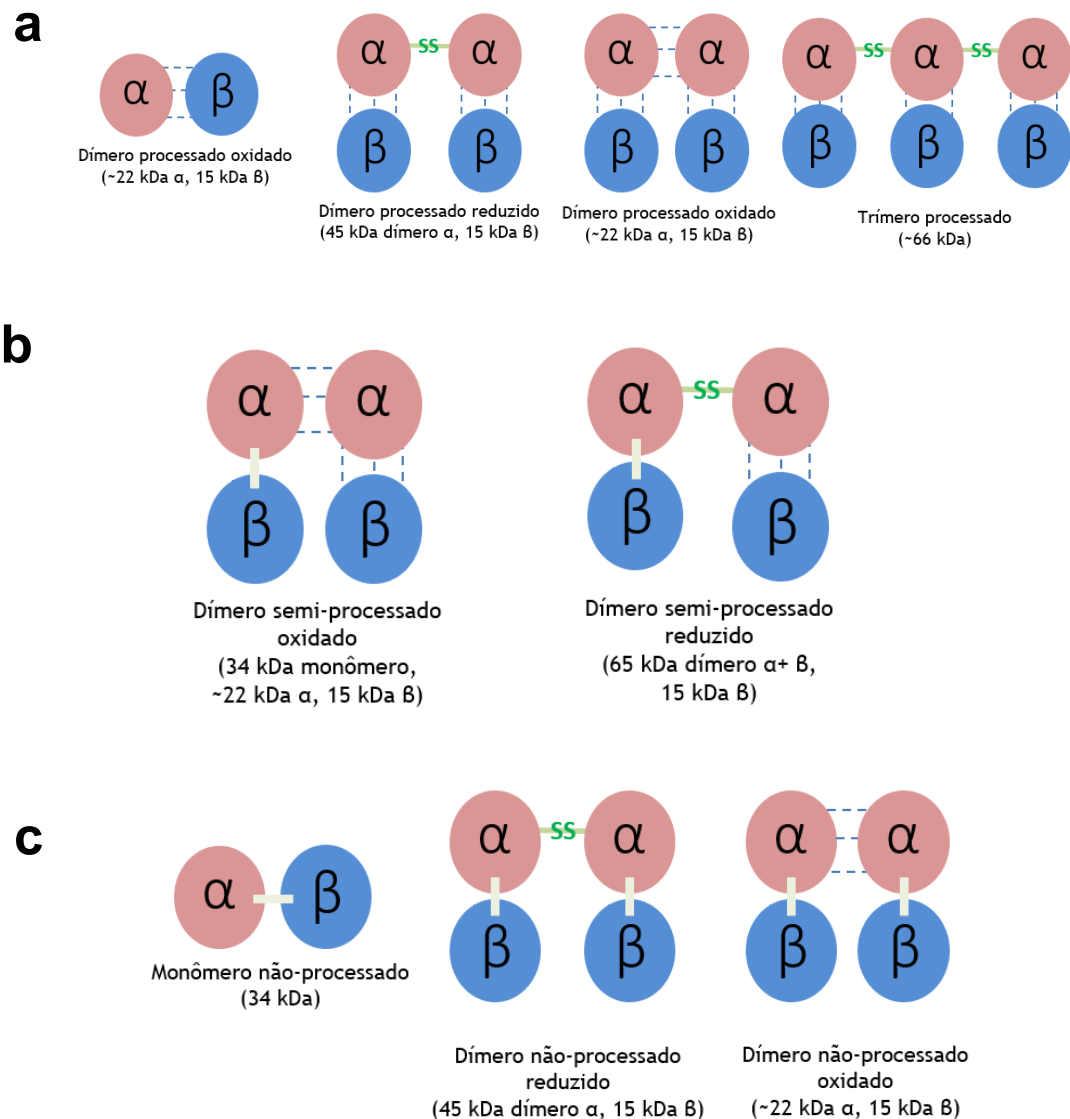


FIGURA 7: Oligomerizações de hASRGL1. Linhas tracejadas representam interações fracas entre subunidades da proteína. Linhas esverdeadas com “SS” representam pontes dissulfeto entre subunidades α. **a)** formas processadas. **b)** formas semi-processadas. **c)** formas não-processadas.

Fonte: O AUTOR, 2020.

Já foi observado que o estado de oligomerização de hASRGL1 tem influência sobre a atividade enzimática da proteína. Um estudo demonstrou que, quanto maior o estado de oligomerização de hASRGL1, maior sua atividade enzimática, ou seja, trímeros têm mais atividade que os dímeros, que, por sua vez, têm mais atividade que

monômeros (MORAIS *et al.*, 2020). A oligomerização pode ser vantajosa ao aumentar a estabilidade da enzima, ou até favorecer a atividade enzimática por meio do aumento da concentração de enzimas na solução (MARIANAYAGAM; SUNDE; MATTHEWS, 2004).

A compreensão das formas oligoméricas de hASRGL1 é essencial para entender os resultados desta monografia, uma vez que cada oligômero se apresenta em diferentes perfis eletroforéticos no SDS-PAGE (FIGURA 8). A presença de agentes redutores no tampão de amostra da eletroforese nem sempre é suficiente para desfazer ligações covalentes fortes, como as de pontes dissulfeto (MORAIS, 2017). Já as interações fracas entre as subunidades α e β são facilmente desfeitas durante a corrida eletroforética, permitindo a separação das subunidades e a formação de bandas individuais. É importante ressaltar que, na prática, técnicas como SEC (do inglês, *Size Exclusion Chromatography*), DLS (do inglês, *Dinamic Light Scattering*) e SAXS (do inglês, *Small-angle X-ray Scattering*) são as mais utilizadas para definir o estado oligomérico de proteínas.

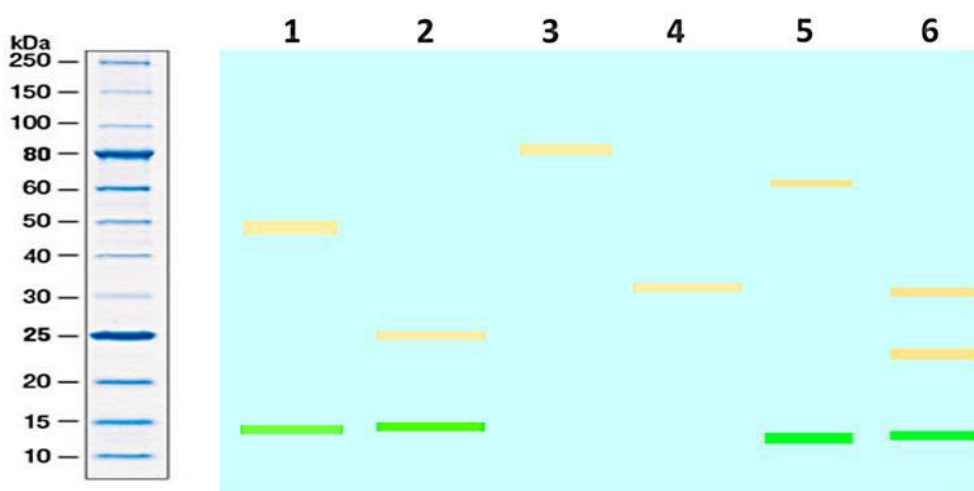


FIGURA 8: Perfil eletroforético teórico de dímeros de hASRGL1. Bandas amarelas representam a cadeia α e bandas verdes a cadeia β de hASRGL1. 1- dímero reduzido processado (45 kDa - cadeia α com ponte dissulfeto, 15 kDa - cadeia β), 2- dímero oxidado processado (22 kDa - cadeia α , 15 kDa - cadeia β), 3- dímero reduzido não-processado (75 kDa – monômeros não-processados ligados por ponte dissulfeto), 4- monômero não-processado (35 kDa - cadeia polipeptídica contínua), 5- dímero semi-processado reduzido (65 kDa - duas cadeias α ligadas por ponte dissulfeto e uma β , 15 kDa - cadeia β), 6- dímero semi-processado oxidado (38 kDa - monômero não-processado, 22 kDa - cadeia α , 15 kDa - cadeia β do monômero clivado).

FONTE: MORAIS, 2017.

1.2.2.2. Vantagens do uso de L-asparaginase humana na clínica

Os benefícios do uso terapêutico de hASRGL1 são vantajosos, uma vez que poderia reduzir a imunogenicidade e a toxicidade do tratamento (NOMME *et al.*, 2012); possui estabilidade térmica ($T_M = 65,3^\circ\text{C}$) suficiente para ser utilizada como medicamento (LI *et al.*, 2016; MORAIS, 2017); possui afinidade para L-asparagina ($K_M = 3,4 \text{ mM}$) e não possui atividade glutaminase (CANTOR *et al.*, 2009). Porém, seu uso terapêutico ainda está limitado devido à sua baixa atividade *in vitro*, tendo K_m na ordem de μM , sendo necessário K_m na ordem de mM para uso na clínica, uma vez que a enzima necessita de uma autoclivagem em sua estrutura para ser ativada. Produzir hASRGL1 seria de grande valia para a compreensão do seu mecanismo de autoprocessamento e assim, contribuir para a inclusão futura da enzima humana no tratamento de LLA. Estudos com engenharia de proteínas vêm buscando alterar a estrutura/sequência de hASRGL1 a fim de aumentar sua atividade *in vitro* por meio da promoção do autoprocessamento.

1.3. PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS

Proteínas têm se mostrado ferramentas valiosas para o tratamento de diversas patologias. Desde 1977, com o advento da primeira proteína humana recombinante, a somatostatina (GILBERT *et al.*, 1977), houve um *boom* no desenvolvimento de novas proteínas terapêuticas. Isso promoveu a produção e comercialização de biofármacos como insulina, interferon- $\beta 1a$ e eritropoietina para tratar diabetes, hepatite e doença renal crônica respectivamente (DINGERMAN, 2008). Assim, a produção destas biomoléculas é fundamental na busca de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de diferentes doenças.

A produção recombinante de proteínas se dá por meio de micro-organismos, como bactérias e fungos, os quais são modificados geneticamente a fim de sintetizarem as proteínas de interesse (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Um dos micro-organismos mais comumente usados é a bactéria *E. coli*, devido à rápida duplicação celular *in vitro*, à facilidade de obtenção de recombinantes cromossomais ou plasmidiais e ao baixo custo de manipulação em pequena e larga escala (CRONAN, 2006).

1.3.1. Expressão de proteínas em *E. coli*

Genes de proteínas específicas podem ser clonados e inseridos em bactérias, como *E. coli*, a fim de expressá-los utilizando a maquinaria molecular da própria bactéria. O uso de ferramentas de engenharia genética permitiu criar cepas de *E. coli* recombinantes que melhoram a expressão heteróloga de proteínas. Dentre as cepas de *E. coli* comercializadas para este fim, a BL21 (DE3) é a mais popular, uma vez que ela possui o gene da T7 RNA polimerase, o qual sintetiza uma RNA polimerase específica para vetores plasmidiais controlados pelo promotor T7 (SAMUELSON, 2011). Isso permite um melhor controle da produção basal da proteína de interesse. Algumas cepas derivadas de BL21 (DE3), como C41 (DE3) e C43 (DE3), foram geneticamente modificadas para aumentar tolerância frente a síntese de proteínas tóxicas (WAGNER *et al.*, 2008).

Para induzir a expressão da proteína de interesse, geralmente utiliza-se uma molécula que se liga a um sítio específico na região regulatória/promotora do gene que a codifica. O indutor mais recorrente é o isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), um análogo da lactose que se liga ao promotor *lac* de plasmídeos que o contém. A partir da expressão da proteína, o processo *downstream* segue em busca da purificação desta por métodos que variam conforme características da biomolécula, podendo ser realizada a purificação diretamente a partir da fração solúvel do lisado celular ou sendo necessária uma etapa de solubilização de proteínas presentes em corpos de inclusão na fração insolúvel do lisado celular. Durante o processo de solubilização, a proteína pode sofrer desnaturação quando solubilizada por agentes como ureia, sendo necessário posterior renovelamento para recuperar sua conformação nativa. Na Figura 9, está apresentado um fluxograma com os passos da produção de proteínas recombinantes.

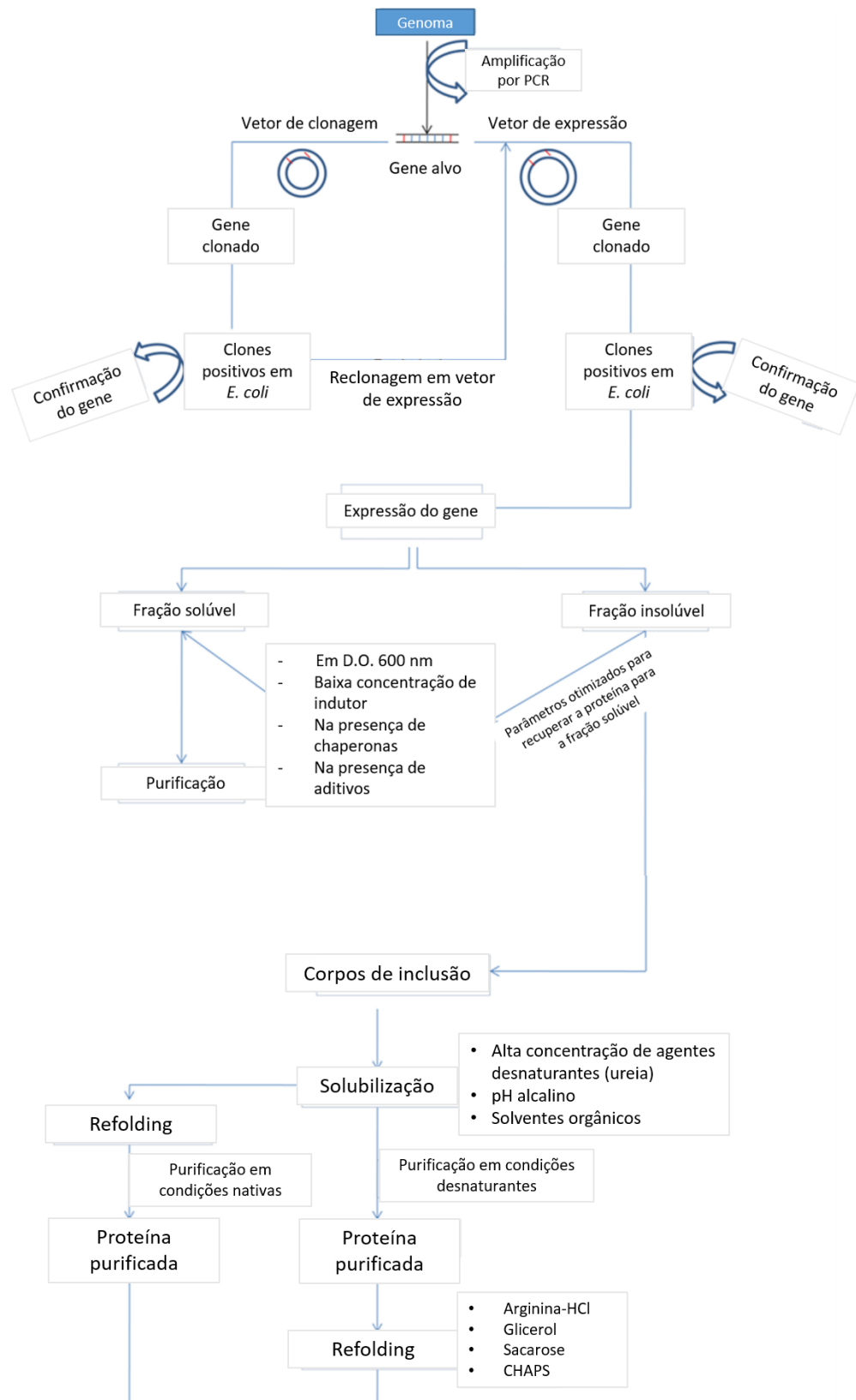


FIGURA 9: Fluxograma da produção de proteínas recombinantes.
 FONTE: Adaptado de KAUR *et al.*, 2018

1.3.2. Métodos de purificação de proteínas

Após a expressão da proteína de interesse, é necessário separá-la dos outros componentes bacterianos por métodos de purificação, sendo a cromatografia a principal metodologia para purificação de proteínas (COSKUN, 2016). Essa técnica se baseia na separação de misturas que se distribuem em uma fase móvel e uma fase estacionária (COLLINS *et al.*, 2006). Basicamente, a diferença de propriedades moleculares dos compostos da mistura vai promover a interação destes com a fase estacionária de forma única, permitindo a separação dos compostos por carga, hidrofobicidade, afinidade, peso molecular ou outras propriedades químicas. Alguns exemplos de cromatografia amplamente utilizados na purificação de proteínas são cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica e exclusão de tamanho.

A melhor metodologia para este escopo depende das propriedades moleculares intrínsecas da proteína a ser purificada. Em geral, é necessário realizar mais de uma etapa de purificação para obter a proteína de interesse com alto grau de pureza. No entanto, quanto mais purificações forem realizadas, menor o rendimento final da proteína, uma vez que se perde amostra durante as etapas. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de um protocolo específico de purificação para cada proteína.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto é desenvolver um método aprimorado de expressão e purificação de hASRGL1 a fim de obter alto rendimento e pureza da proteína.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar bibliografia de protocolos de expressão e purificação de hASRGL1;
- Estabelecer um protocolo de expressão de hASRGL1 em *E. coli*;
- Estabelecer um protocolo de purificação de hASRGL1 por métodos cromatográficos.

3. JUSTIFICATIVA

A produção recombinante de hASRGL1 se faz necessária para possibilitar estudos mais aprofundados acerca desta enzima, principalmente em relação ao mecanismo de autoprocessamento. A obtenção de hASRGL1 purificada pode viabilizar estudos estruturais acerca da proteína, por meio de técnicas específicas como cristalografia de raios-x.

Além disso, pode possibilitar estudos funcionais da enzima em culturas de células cancerosas, uma vez que existe potencial em utilizá-la como medicamento no futuro. Ademais, o estabelecimento de um protocolo de produção de hASRGL1 em escala laboratorial pode abrir caminho para seu escalonamento em escala industrial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. SOLUÇÕES E TAMPÕES

- Tampões para transformação de bactérias cálcio-competentes:
 - Tampão de Transformação I: CH₃COOK 30 mM pH 5,8, MgCl₂ 50 mM, RbCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15% (w/v)
 - Tampão de Transformação II: MOPS 10 mM pH 6,8, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15% (w/v)
- Tampões para análise de proteínas por SDS-PAGE e *Western Blot*:
 - Tampão de lise: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol 10% (w/v), Triton-100 1% (w/v), PMSF 1 mM
 - Tampão de amostra de proteínas: Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%, β-mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%.
 - Tampão de corrida para SDS-PAGE: Tris-HCl 0,037 M pH 8,4; Glicina 192 mM pH 8,4; SDS 0,1%.
 - Solução 1 para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE: Azul de Coomassie R-250 0,1% em metanol/ácido acético v/v (45%:10%); água 45%.
 - Solução de descoloração de proteínas: Metanol 30%, ácido acético 10%, água 60%.

- Solução 2 para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE: Coomassie Brilliant Blue G-250 60 mg; HCl concentrado 0,3%; água 99,97%.
 - Tampão de transferência para *Western blot*: Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%.
 - Solução de bloqueio para *Western Blot*: Tampão PBS, Tween-20 0,1% e leite em pó desnatado 5%.
 - Tampão PBS - solução de uso (Phosphate-buffer saline): KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,5 mM, $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,3 mM; NaCl 137 mM.
 - Tampão PBS – Tween-20: PBS -Tween-20 0,1%.
- Tampões de renovelamento (segundo Kante *et al.*, 2018):
 - Tampão de lavagem: glicina 15 g/L pH 8,5, EDTA 2 g/L, Triton-100x 0,5 g/L, NaCl 10 g/L, sacarose 2 g/L
 - Tampão de lise: glicina 20 g/L pH 8,5, EDTA 2 g/L, glicerol 60 mL, NaCl 15 g/L, fosfato de sódio monobásico diidratado 0,2 g/L, benzamidina 5 mM
 - Tampão de solubilização de corpos de inclusão: Tris 5 g/L pH 8,5, ureia 8 M, NaCl 5 g/L, EDTA 5 mM
 - Tampão de renaturação: Tris 0,2 M pH 9, ureia 0,5 M, L-cisteína 100 mM, arginina 10 mM
- Tampões utilizados na cromatografia de afinidade (segundo Nomme *et al.*, 2012)
 - Tampão A: Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, glicerol 10%, Triton-100x 1%, PMSF 1 mM
 - Tampão B: Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, glicerol 10%, Triton-100x 1%, PMSF 1 mM, imidazol 500 mM
- Tampões utilizados na cromatografia de afinidade no protocolo de renovelamento
 - Tampão C: Fosfato de sódio pH 7,4 50 mM, Tween-20 0,01%, NaCl 500 mM
 - Tampão D: Fosfato de sódio pH 7,4 50 mM, Tween-20 0,01%, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM
- Tampões utilizados na cromatografia por exclusão de tamanho (segundo Nomme *et al.*, 2012)
 - Tampão E: Tris-HCl 25 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, DTT 2 mM

- Tampões utilizados na cromatografia de troca aniônica (segundo Kante *et al.*, 2018)
- Tampão F: Fosfato de sódio 25 mM pH 7,4, 0,01% Tween-20
- Tampão G: Fosfato de sódio 50 mM pH 7,4, EDTA 0,5 M 0,1%, NaCl 1 M

4.2. MEIOS DE CULTURA

- Meio LB (*Luria-Bertani*): bacto-triptona (10,0 g/L), NaCl (5,0 g/L), extrato de levedura (5,0 g/L)
- LB-ágar: adição de 1,5% de ágar-ágar no meio LB

4.3. MICRO-ORGANISMOS

- Genótipo *E. coli* BL21 C41 (DE3): {F-*ompT hsdSB (rB - mB -) gal dcm* (DE3)}
- Genótipo *E. coli* BL21 Star (DE3): {F-*ompT hsdSB (rB - mB -) gal dcmrne131* (DE3)}

4.4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DE PROTOCOLOS DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE hASRGL1

Foi feita busca na literatura por protocolos de expressão e purificação de hASRGL1 em bancos de artigos científicos como *PubMed* e *Science Direct*. A busca seguiu critérios como maior rendimento, pureza, atividade enzimática e atividade biológica da enzima, buscando condições que geram uma proteína funcional e estruturada. Os protocolos foram adaptados conforme necessário durante os experimentos, tendo em vista a pureza e rendimento obtidos.

4.5. GERAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE hASRGL1

O gene sintético para a proteína hASRGL1 foi desenhado utilizando a sequência depositada no *GenBank* (GI:20799289) e sintetizado pela empresa *GenScript*. A sequência codificante para hASRGL1 encontra-se clonada em vetor de expressão pET-28aTEV.

4.6. PREPARO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES

As cepas a serem utilizadas na expressão de hASRGL1 foram submetidas ao método do CaCl_2 (Sambrook *et al.*, 2001). Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado. O inóculo foi incubado a 37°C, *overnight*, sob agitação de 200 rpm. Um volume de 1 mL desta cultura foi transferido para 250 mL de meio LB. As células foram incubadas a 37°C sob as mesmas condições de agitação até alcançar a fase de crescimento exponencial (D.O._{600nm} de 0,6).

A cultura foi centrifugada a 2700 x g por 10 min a 4°C e o pellet de células foi suspenso em 30 mL de Tampão de Transformação I, sendo mantido no gelo durante 15 minutos. A suspensão foi submetida à uma centrifugação de 580 x g por 15 minutos a 4°C, as células foram suspensas em 10 mL de Tampão de Transformação II, mantidas no gelo seco por 2 horas e em seguida aliquotadas e armazenadas a -80°C.

4.7. EXPRESSÃO RECOMBINANTE DE hASRGL1 EM *E. coli*

4.7.1. Expressão de hASRGL1 a partir da fração solúvel do lisado celular

A partir do protocolo de Nomme *et al.*, 2012, o vetor pET-28aTEV_hASRGL1 foi incubado em células de *E. coli* termo-competentes utilizando a cepa BL21 (DE3) C41 a 4°C por 30 min. As células foram submetidas a choque térmico a 42°C por 2 min e, em seguida, 4°C por 2 min. Após o choque térmico, 1 mL de meio LB foi adicionado no microtubo contendo as bactérias transformadas, as quais foram incubadas a 37°C, por 1 h, a 200 rpm. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar com canamicina (25 mg/mL), uma vez que o vetor pET-28aTEV_hASRGL1 confere resistência a este antibiótico, e incubadas a 37°C *overnight*.

Uma colônia isolada da placa foi inoculada em pré-inóculo de 20 mL de meio LB líquido com canamicina (25 µg/mL) por 3 h a 37°C. Um volume de 5 mL do pré-inóculo foi despejado em inóculos finais de 500 mL de meio LB (diluição 1:100) em *Erlenmeyers* de 2 L, totalizando 4 L de inóculo final. Os inóculos finais foram incubados a 37°C a 200 rpm até as células atingirem a fase log de crescimento (D.O._{600nm} entre

0,6 e 0,8). As culturas foram aclimatadas a 18°C por 30 min para, então, serem induzidas com IPTG 0,5 mM e mantidas a 18°C *overnight*, sob agitação de 200 rpm.

As células foram coletadas por centrifugação a 6000 x *g* por 15' a 4°C e os *pellets* foram ressuspensos em tampão de lise (20 mL/L de expressão). A lise foi feita por sonicação (A = 90%, 10 ciclos de 30 s com pulsos 1 s *on/off*) seguida de ultracentrifugação a 30000 x *g*, por 1 h a 4°C, a fim de separar sobrenadante e *pellet*, ou seja, fração solúvel e insolúvel, respectivamente. A fração solúvel do lisado bacteriano foi utilizada para purificações posteriores.

4.7.2. Expressão de hASRGL1 a partir da fração insolúvel do lisado celular

A partir do protocolo de Kante *et al.*, 2018, o vetor pET-28aTEV_hASRGL1 foi inserido em células de *E. coli* termo-competentes da cepa BL21 (DE3) Star por choque térmico da mesma forma descrita no item 4.7.1. Em seguida, as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB sólido com canamicina (25 mg/mL) e incubadas a 37°C *overnight*. Uma colônia isolada da placa foi inoculada em pré-inóculo de 20 mL de meio LB líquido com 25 µg/mL de canamicina por 16 h.

Foi feita uma diluição 1:100 do pré-inóculo para o inóculo final, o qual continha 1 L de meio LB líquido com canamicina (25 µg/mL) em *Fernbachs* de 2,8 L, totalizando 2 L de inóculo final. Os inóculos finais foram incubados a 37°C a 200 rpm até as células atingirem a fase log de crescimento (analisado por meio da medição de D.O._{600nm} em 0,6). As culturas foram induzidas com 1 mM de IPTG e mantidas sob agitação a 200 rpm por 4 h a 37°C, uma vez que altas temperaturas durante a indução favorecem a formação de corpos de inclusão. Após a indução, a cultura foi centrifugada a 14000 x *g* por 15 min a 8°C.

O *pellet* de células foi solubilizado em vortex após ressuspensão em 10 mL/litro de expressão em Tampão de Lavagem, descrito no item 4.1, a fim de retirar parte dos ácidos nucleicos, LPS e outras impurezas da amostra. O lavado foi centrifugado a 14000 x *g* a 4°C por 20 min. Em seguida, 10 mL de Tampão de Lise a cada grama de bactéria foi utilizado para solubilizar o lavado. A lise foi feita em sonicador (Q700 SONICATOR, QSONICA) utilizando amplitude de 40% com 7 ciclos de pulsos de 11 s, com intervalos de 30 s entre os pulsos. O lisado foi centrifugado a 15000 x *g* a 4°C

por 30 min e apenas o *pellet* (fração insolúvel) contendo corpos de inclusão seguiu para etapas posteriores.

A fração insolúvel foi incubada com 6 mL de Tampão de Solubilização de corpos de inclusão sob agitação de 300 rpm, a 25°C por 60 min. Após solubilização completa dos corpos de inclusão, a amostra foi centrifugada a 14000 x *g*, a 4°C por 30 min. Em seguida, o sobrenadante contendo a proteína de interesse em solução teve seu pH corrigido de 8,5 para 10,5 e, posteriormente, foi diluído 16 vezes com Tampão de Renaturação em temperatura ambiente a fim de devolver a conformação nativa da proteína de interesse. A amostra renaturada e diluída foi concentrada com Amicon Ultra 10 (10000 MWCO, Millipore) para purificações subsequentes.

4.8. PURIFICAÇÃO DE hASRGL1 POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

As purificações utilizaram o sistema FPLC (do inglês, *Fast Performance Liquid Chromatography*) Äkta (GE Healthcare), o qual consiste em um sistema automatizado que utiliza um tampão como fase móvel e uma coluna com resina porosa como fase estacionária. A coluna a ser utilizada variou conforme o método cromatográfico (cromatografia de afinidade, troca iônica, exclusão de tamanho). Outros parâmetros como fluxo, tampão, pH, tamanho da coluna também variaram conforme especificidades da proteína. As purificações também foram adaptadas dos protocolos de Nomme *et al.*, 2012 e Kante *et al.*, 2018, para as frações solúvel e insolúvel do lisado celular respectivamente.

4.8.1. Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade se baseia na ligação da proteína de interesse a um componente presente na resina da coluna cromatográfica (FIGURA 10). O vetor pET-28aTEV_hASRGL1 possui sequência codificante para uma cauda de histidina na posição N-terminal, o que possibilita a purificação utilizando uma coluna com resina de níquel HisTrap HP 1 mL ou 5 mL (GE Healthcare), a qual interage com os anéis imidazol da cadeia lateral da *His tag* (DANIELSSON, 2018). Foram utilizados os tampões A e B descritos no item 4.1.

A partir do protocolo de Nomme *et al.*, 2012, a coluna foi equilibrada com tampão A. Em seguida, a amostra contendo a proteína alvo foi injetada na coluna e, depois, lavada com tampão A para desfazer ligações inespecíficas de proteínas na coluna. Ao longo da eluição com imidazol, foi utilizado gradiente de 0-100% de tampão B em 20 CVs. Dependendo da presença de picos de absorbância, o gradiente de tampão B foi colocado em hold a fim de otimizar a separação de proteínas durante a cromatografia. As frações foram coletadas em volume de 1 mL para posterior avaliação por SDS-PAGE. Por fim, as amostras com maior pureza foram unidas e concentradas com Amicon Ultra 10 (10000 MWCO, Millipore).

No protocolo de renovelamento, foi feita uma etapa extra de cromatografia de afinidade utilizando os tampões C e D (item 4.1). Os procedimentos durante a cromatografia foram os mesmos descritos acima no protocolo de Nomme *et al.*, 2012.

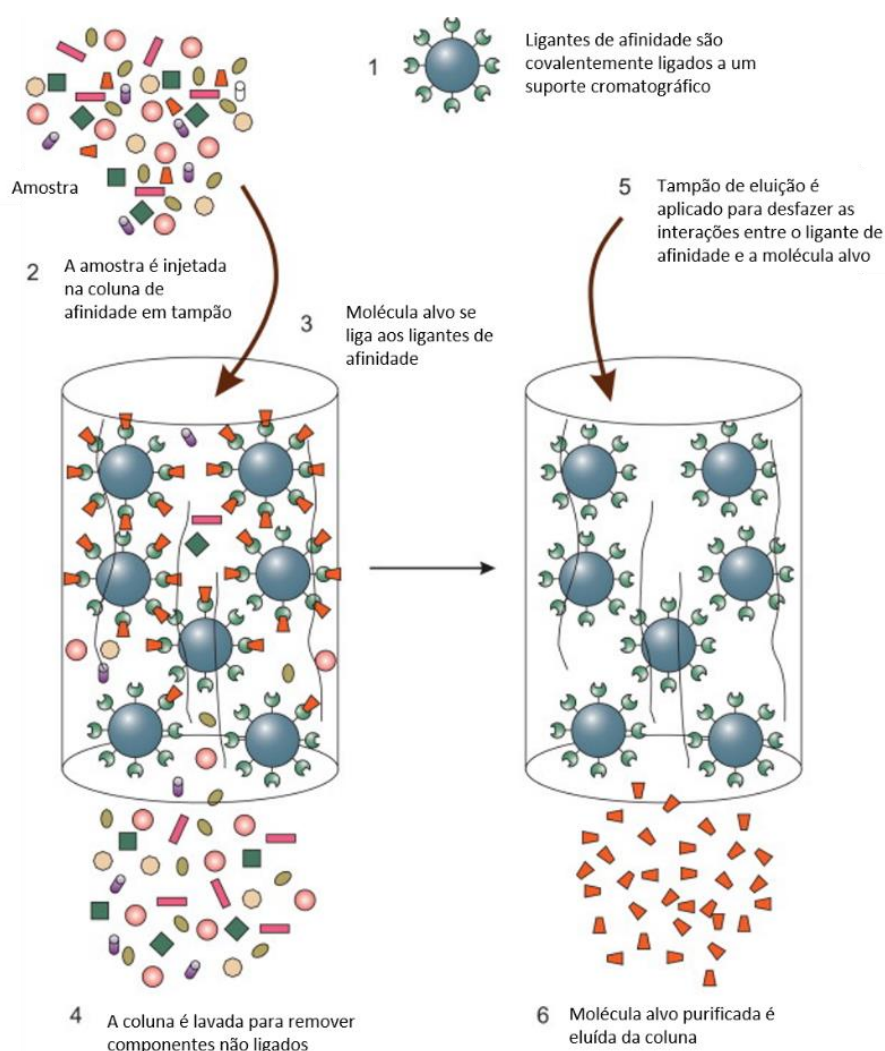


FIGURA 10: Esquema do mecanismo da cromatografia de afinidade.

FONTE: Adaptado de Science Direct.

4.8.2. Cromatografia por troca iônica

A cromatografia por troca iônica se baseia na interação de cargas entre a proteína a ser purificada e a resina da coluna de cromatografia carregada positiva ou negativamente (COLLINS *et al.*, 2006; DIAS, 2010) (FIGURA 11). Foi utilizada a coluna HiTrap Q HP 5 mL (GE Healthcare), a qual possui resina carregada positivamente. A cromatografia de troca aniônica foi escolhida uma vez que o pI teórico da hASRGL1 é de 6,27 (MORAIS, 2017), portanto, em pH fisiológico (7,4), a proteína terá carga negativa.

A partir do protocolo de Kante *et al.*, 2018, a coluna foi equilibrada com tampão F (item 4.1), a amostra da fração insolúvel foi injetada na coluna e lavada com tampão F. A eluição foi feita em gradiente 0-100% com 20 CVs de tampão G (item 4.1), com *holds* manuais quando picos de absorbância eram identificados. As frações foram coletadas, analisadas em SDS-PAGE, unidas e concentradas conforme descrito no item 4.8.1. As frações que seguiram para cromatografia de afinidade foram diluídas até atingirem, ao menos, 500 mM de NaCl, visando evitar precipitação da amostra, e depois concentradas novamente, caso necessário, com o Amicon Ultra 10 (10000 MWCO, Millipore).

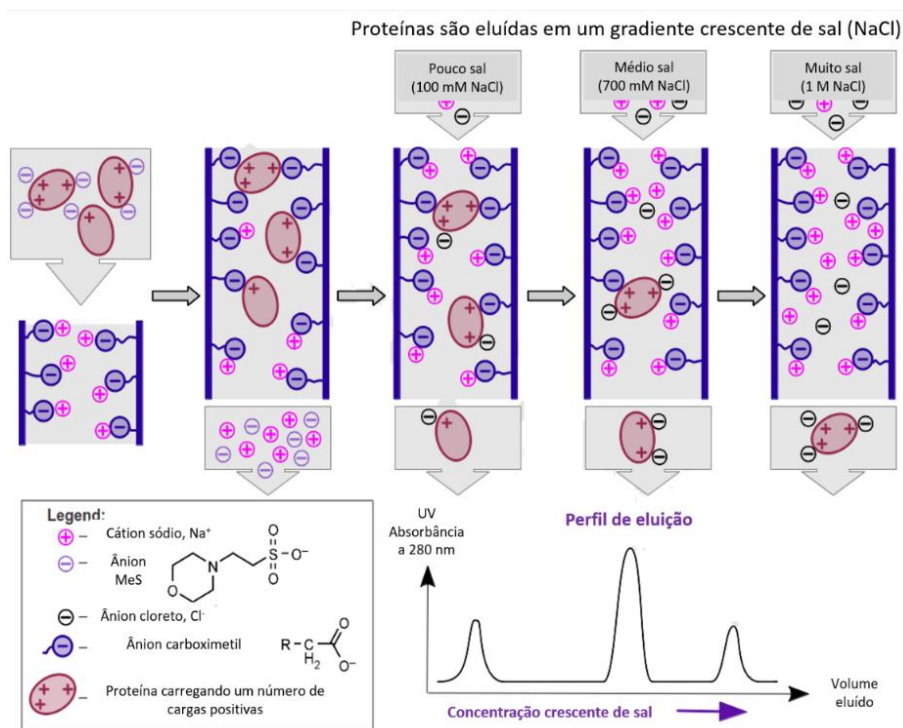


FIGURA 11: Esquema do mecanismo da cromatografia por troca iônica.

FONTE: Adaptado de Reach Devices.

4.8.3. Cromatografia por exclusão de tamanho

A cromatografia por exclusão de tamanho (também chamada de SEC, do inglês *Size Exclusion Chromatography*) é uma técnica que separa compostos de acordo com seu raio hidrodinâmico e peso molecular (FEKETE *et al.*, 2014) (FIGURA 12). A coluna HiLoad Prep Grade Superdex 200 16/600 (GE Healthcare) foi utilizada, sendo equilibrada com tampão E (item 4.1). Cerca de 400 µL de amostra foram injetadas na coluna e a eluição foi feita com 1,5 CV de tampão C. As frações coletadas foram concentradas separadamente e a concentração de proteínas foi dosada conforme o item 4.9, além de serem analisadas em SDS-PAGE e *Western Blot*, conforme item 4.10.

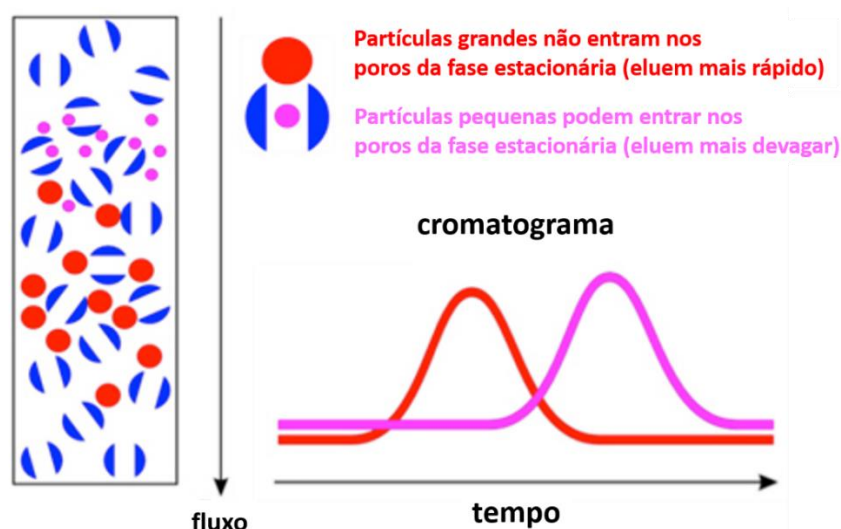


FIGURA 12: Esquema do mecanismo da cromatografia por exclusão de tamanho.

FONTE: Adaptado de Pronalyse.

Foi feita uma curva de calibração da coluna HiLoad Prep Grade Superdex 200 16/600 visando determinar os pesos moleculares de cada fração da SEC a partir de seus volumes de eluição. *Bluedextran* foi utilizado para determinar o volume morto da coluna, e, então, foi feita uma corrida utilizando amostras de pesos moleculares conhecidos. A partir destes valores e considerando V_e (Volume de eluição), V_o (volume morto) e V_c (volume da coluna, de 124 mL), foi utilizada equação abaixo para realizar a curva de calibração:

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_c - V_o)}$$

4.9. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Após todas as etapas de purificação, as amostras finais purificadas foram dosadas por meio da plataforma Qubit® (Invitrogen). Foi utilizado um fluoróforo do kit *Qubit Protein Assay Kit*, o qual se liga às proteínas, marcando-as para leitura de absorbância no aparelho Qubit® a 260 nm. O preparo das amostras seguiu o protocolo constante no manual de instruções do fabricante. Além disso, foi utilizado o programa GelAnalyzer para quantificação aproximada de bandas correspondentes a hASRGL1 em SDS-PAGE de amostras finais purificadas, diferenciando a proteína alvo de contaminantes.

4.10. WESTERN BLOT

A confirmação da presença de hASRGL1 nas amostras purificadas foi feita por meio de *Western Blot*. O SDS-PAGE das frações purificadas selecionadas da SEC foi transferido a 15 V por 35 min para uma membrana de PVDF previamente ativada com metanol. A membrana foi corada com Ponceau e, então, bloqueada com leite em pó (5%) em PBS-Tween 0,05% e incubada com o anticorpo primário anti-hASRGL1 ou *anti-His tag* a 4°C *overnight*. Após lavagens, o anticorpo secundário *anti-rabbit* foi incubado com a membrana por 2 horas, sendo lavada posteriormente em PBS. A membrana foi revelada por quimioluminescência no aparelho LPIX Chemi (Loccus Biotecnologia).

5. RESULTADOS

5.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DE PROTOCOLOS DE hASGRL1

A partir dos critérios de maior rendimento, pureza, atividade enzimática e atividade biológica da enzima, foram selecionados os protocolos de expressão de hASRGL1 feitos por Nomme *et al.*, 2012 e Kante *et al.*, 2018. O primeiro foi utilizado como modelo para expressão de hASRGL1 na forma solúvel, e o último na forma insolúvel para renovelamento (ou *refolding*) posterior. Ambos os protocolos sofreram

adaptações pertinentes visando o aumento do rendimento e pureza das amostras de hASRGL1.

5.2. PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE hASRGL1

5.2.1. Expressão 1 a partir da fração solúvel do lisado celular (E1)

O crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) C41 atingiu uma D.O._{600nm} média de 0,792 antes da indução com IPTG 0,5 M. O extrato total (FIGURA 13) apresentou bandas que sugerem a presença de monômero não-processado (34 kDa) de hASGRL1, dímero processado reduzido (44 kDa) e dímero não-processado reduzido ou trímero processado reduzido (66 kDa).

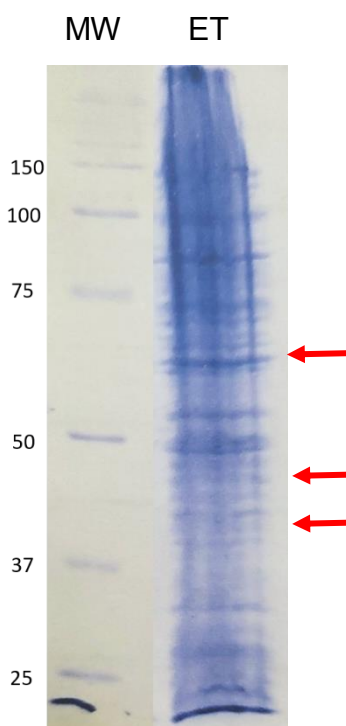


FIGURA 13: Extrato total do lisado celular em E1. Em setas vermelhas, as bandas que sugerem presença de monômero não-processado, dímero processado reduzido e dímero não-processado reduzido. Legenda: MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad), ET – Extrato total

5.2.2. Purificações a partir de E1

5.2.2.1. Cromatografia de afinidade (E1)

Em E1, a fração solúvel do lisado celular foi submetida a cromatografia de afinidade com a coluna HisTrap HP 5 mL. A partir do SDS-PAGE (FIGURA 14b) das frações coletadas da cromatografia, infere-se que hASRGL1 foi eluída no pico correspondente a 14,7-33,2% de tampão B (73,5-166 mM de imidazol) (FIGURA 14a). Desta forma, foram selecionadas e concentradas para a próxima etapa de purificação as frações 87-100, nas quais acredita-se estarem presentes três conformações da hASRGL1: monômero não-processado de hASGRL1, dímero processado reduzido e dímero não-processado reduzido ou trímero processado reduzido, segundo seus respectivos pesos moleculares.

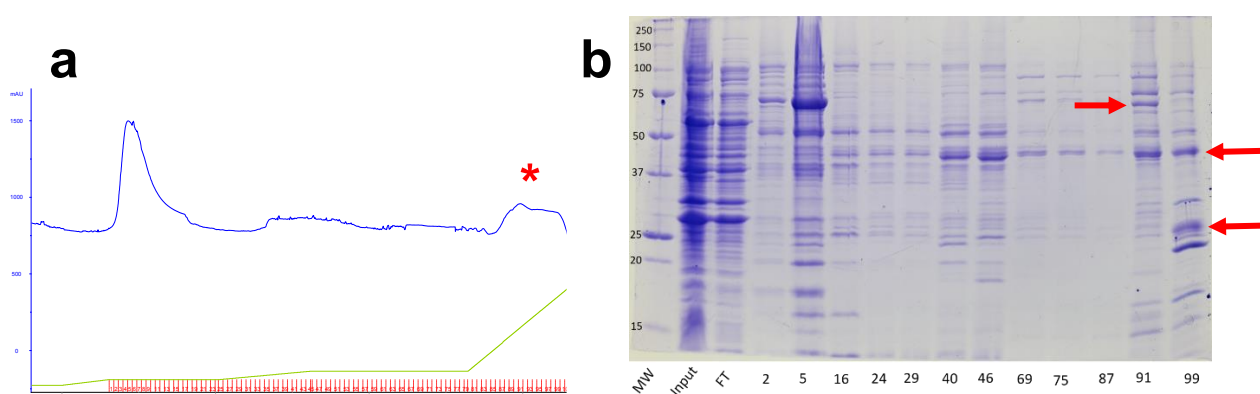
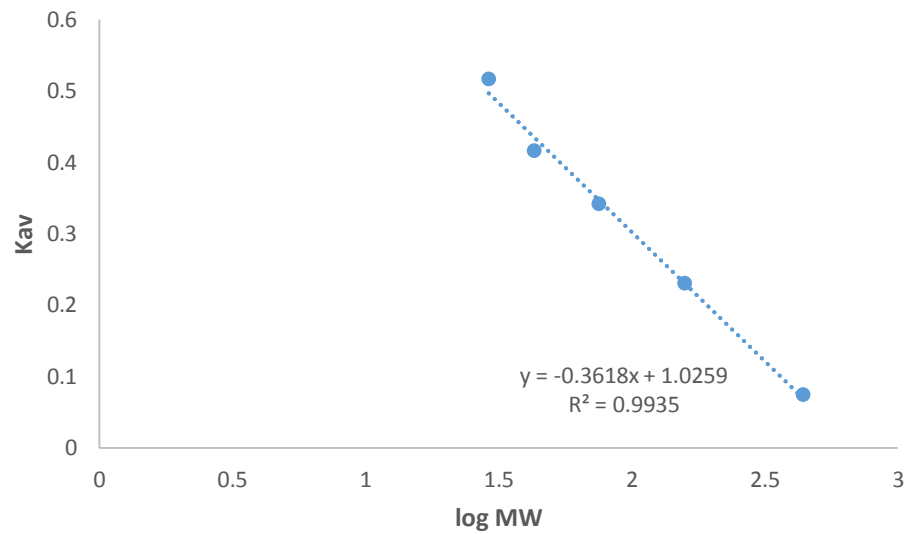


FIGURA 14: Cromatografia de afinidade de hASRGL1 em E1. **a)** Cromatograma ampliado nos picos de eluição. Em asterisco vermelho, o pico no qual infere-se a presença de hASRGL1. **b)** SDS-PAGE das frações 2-99 da cromatografia de afinidade. Corado com *Coomassie Blue* R-250. As setas vermelhas indicam as bandas onde acredita-se encontrar hASRGL1 em diferentes estados oligoméricos. Legenda: MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad), Input – Fração solúvel do lisado celular, FT – *Flow Through*, 2-99 frações da cromatografia de afinidade.

5.2.2.2. Cromatografia por exclusão de tamanho (E1)

A partir dos valores de K_{av} e dos pesos moleculares (MW) conhecidos de proteínas conhecidas em amostra de padrão molecular, foi feito o gráfico K_{av} e log MW abaixo (GRÁFICO 1). A equação da reta foi utilizada para determinar o log MW das frações das SEC de hASRGL1 e, por fim, o MW de cada uma destas frações. Esta curva de calibração foi utilizada na análise de todos os resultados de SEC utilizando a coluna HiLoad Superdex 16/600.

GRÁFICO 1: Curva de calibração da coluna HiLoad Superdex 16/600



A SEC das frações 87-100 da cromatografia de afinidade (FIGURA 15a) apresentou frações com possível presença da hASRGL1. As frações 30-36 (FIGURA 15b) foram selecionadas para serem unidas e concentradas posteriormente, uma vez que foram eluídas na faixa dos volumes de eluição correspondentes ao tamanho de dímero não-processado reduzido e trímero processado reduzido de hASRGL1, respectivamente 70 e 76 mL.

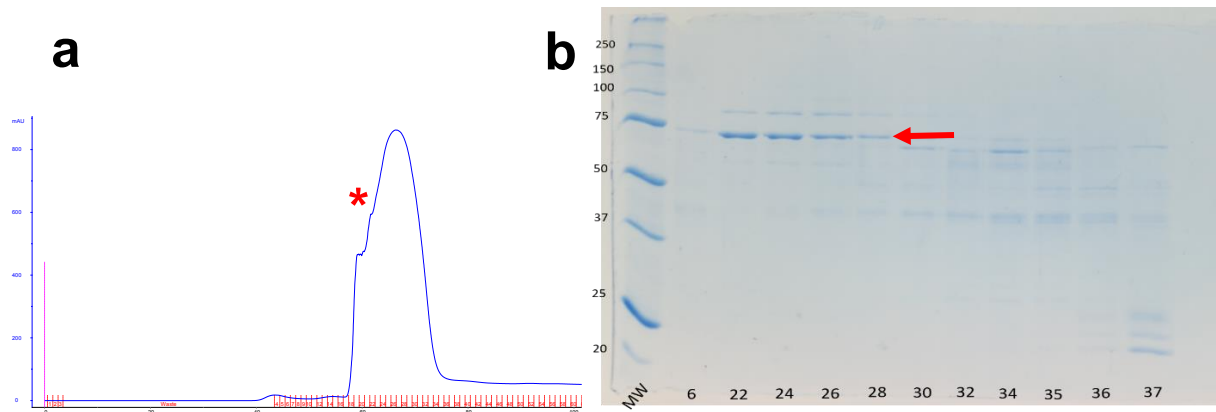


FIGURA 15: SEC de hASRGL1 em E1. **a)** Cromatograma ampliado no pico de eluição. Em asterisco vermelho, a região do pico no qual infere-se a presença de hASRGL1. **b)** SDS-PAGE das frações 6-37 da SEC. Corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Legenda: MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad), 6-37 frações da SEC

5.2.2.3. Análise da produção em E1

A amostra final submetida a *Western Blot* (FIGURA 16) teve uma banda marcada com anticorpo primário anti-hASRGL1 próximo à altura de 66 kDa, confirmando a presença de hASRGL1 na amostra purificada. Esta banda pode corresponder tanto ao dímero não-processado reduzido quanto ao trímero processado reduzido de hASRGL1, os quais possuem pesos moleculares similares. O SDS-PAGE da amostra purificada (FIGURA 16) apresenta uma banda em 66 kDa, corroborando o resultado o *Western Blot*.

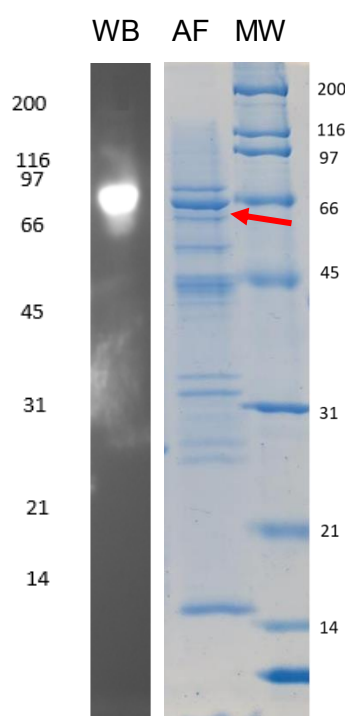


FIGURA 16: *Western Blot* (esquerda) e SDS-PAGE (direita) da amostra final purificada de hASRGL1 de E1. *Western Blot* de hASRGL1 marcado com anticorpo primário anti-hASRGL1. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Legenda: WB – *Western Blot*, AF – amostra final purificada, MW – Marcador de peso molecular (SDS-PAGE *Molecular Weight Standards Broad Range*, BioRad)

A amostra final purificada de E1 apresentou 3,11 mg de proteínas totais. Segundo o GelAnalyser, destes 3,11 mg de proteínas totais, 6,48 µg correspondem a hASRGL1, considerando bandas evidenciadas no *Western Blot*. O rendimento da produção foi de, portanto, 1,62 µg/L de expressão de hASRGL1, considerando que foram feitos 4 L de expressão em E1. A pureza de hASRGL1 foi de cerca de 21%, portanto aproximadamente 79% das proteínas da amostra eram contaminantes.

5.2.3. Expressão 2 da fração solúvel do lisado celular (E2)

O crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) C41 atingiu uma D.O._{600nm} média de 0,720 antes da indução com IPTG 0,5 M. A partir do extrato total do lisado celular (FIGURA 17), foi possível identificar bandas que sugerem presença de monômero não-processado (34 kDa), dímero processado reduzido (44 kDa) e dímero não-processado reduzido ou trímero processado reduzido (66 kDa) na amostra.

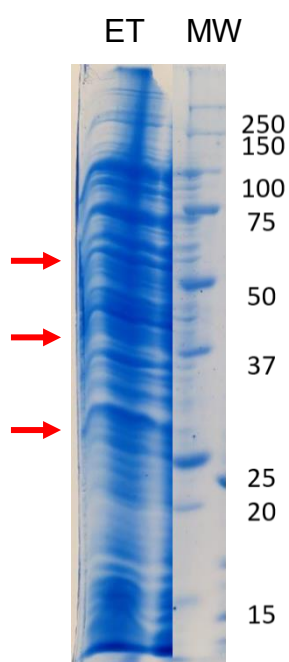


FIGURA 17: Extrato total do lisado celular em E2. Em setas vermelhas, as bandas que sugerem presença de monômero não-processado, dímero processado reduzido e dímero não-processado reduzido. Legenda: MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad), ET – Extrato total

5.2.4. Purificações a partir de E2

5.2.4.1. Cromatografia de afinidade (E2)

Em E2, a fração solúvel do lisado celular foi submetida a cromatografia de afinidade com a coluna HisTrap HP 1 mL, sendo que os tampões usados foram os mesmos. A partir do SDS-PAGE (FIGURA 18b), observou-se hASRGL1 eluída no pico correspondente a 25% de tampão B (125 mM de imidazol), conforme o cromatograma

na FIGURA 18a. As frações 51-55 foram selecionadas para seguirem para a SEC subsequente, nas quais acredita-se estarem as formas de monômero não-processado (34 kDa), dímero processado reduzido (44 kDa) e dímero não-processado reduzido ou trímero processado reduzido (66 kDa).

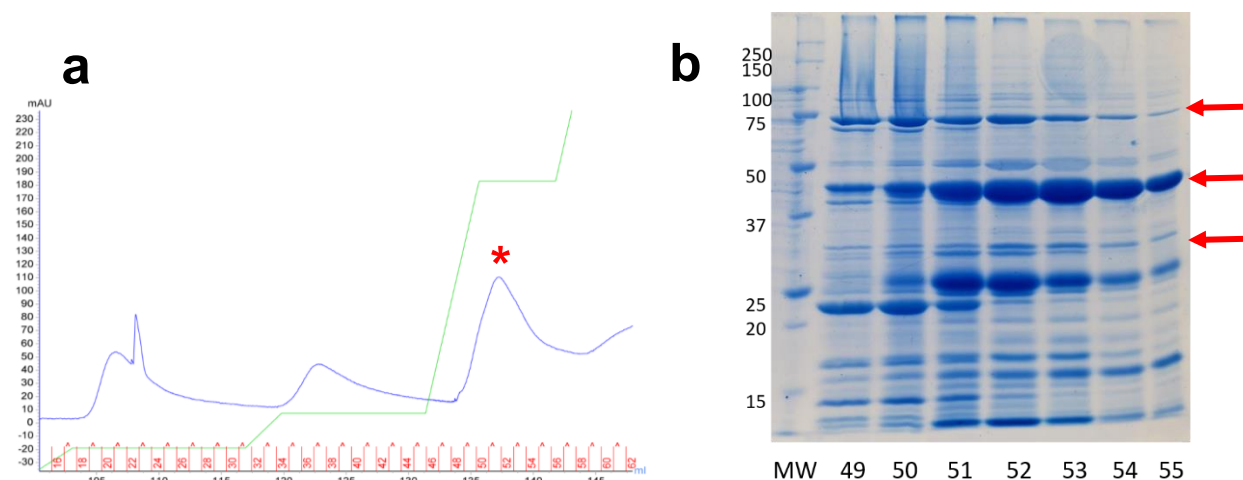


FIGURA 18: Cromatografia de afinidade de hASRGL1 em E2. **a)** Cromatograma ampliado nos picos de eluição. Em asterisco vermelho, o pico no qual infere-se a presença de hASRGL1. **b)** SDS-PAGE das frações 49-55 da cromatografia de afinidade. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. As setas vermelhas indicam as bandas onde acredita-se encontrar hASRGL1 em diferentes estados oligoméricos. Legenda: MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad), 49-55 frações da cromatografia de afinidade.

5.2.4.2. Cromatografia por exclusão de tamanho (E2)

Na SEC das frações 51-55 da cromatografia de afinidade (FIGURA 19a) apresentou frações com possível presença de hASRGL1. Foram selecionadas as frações 39-49 (FIGURA 19b), uma vez que apresentavam volumes de eluição correspondentes aos pesos moleculares de monômero não-processado, dímero processado reduzido e dímero não-processado reduzido ou trímero processado reduzido de hASRGL1, as quais foram unidas e concentradas. Foram identificadas frações contendo bandas próximas a 15 kDa, sugerindo presença de cadeia β e, portanto, processamento de hASRGL1.

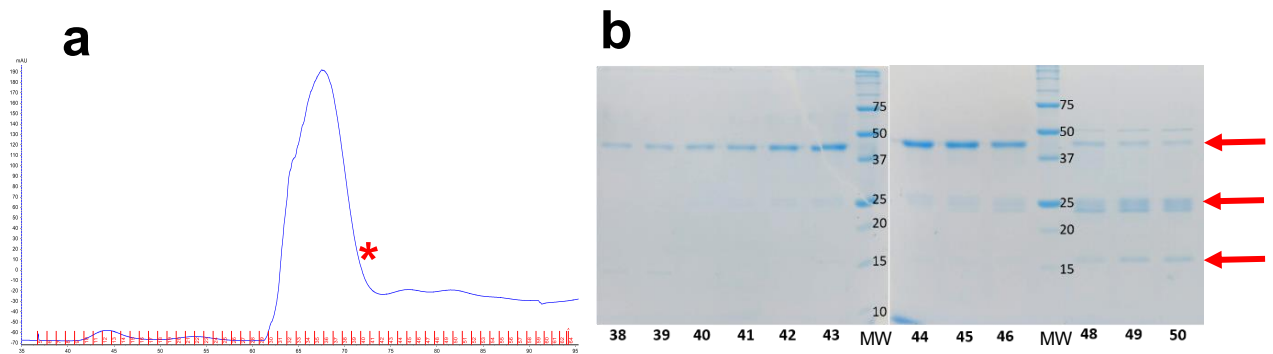


FIGURA 19: SEC de hASRGL1 em E2. **a)** Cromatograma ampliado no pico de eluição. **b)** SDS-PAGE da amostra final purificada. As setas vermelhas indicam as bandas onde acredita-se encontrar hASRGL1 em diferentes estados oligoméricos. Gel corado com *Coomassie Blue* R-250. Legenda: MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad), 38-50 – frações da SEC.

5.2.4.3. Análise da produção em E2

A amostra final purificada foi submetida a *Western Blot* com anticorpo primário policlonal anti-hASRGL1 (FIGURA 20). Foram identificadas duas bandas no *Western Blot*: uma banda em cerca de 44 kDa (dímero de cadeia α) e outra de cerca de 14 kDa (cadeia β). É possível inferir, portanto, que hASRGL1 encontra-se ativa na amostra, uma vez que está em sua forma processada.

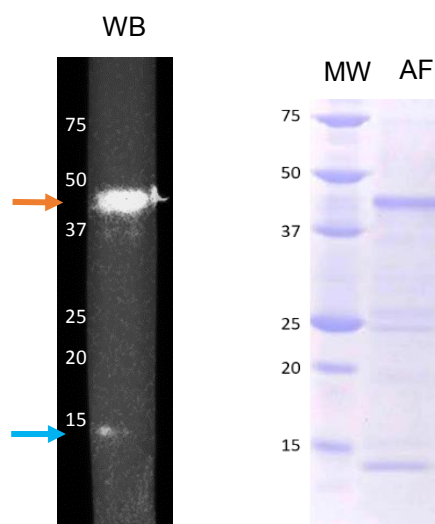


FIGURA 20: *Western Blot* (esquerda) e SDS-PAGE (direita) da amostra final purificada de E2. O anticorpo primário policlonal anti-hASGRL1 marcou a banda de cerca 44 kDa, correspondente a dímero de cadeia α , marcada em seta laranja, e a banda de cerca de 14 kDa, correspondente a cadeia β , marcada em seta azul. Gel corado com *Coomassie Blue* R-250.

Legenda: WB – *Western Blot*, AF – amostra final purificada, MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad)

A amostra final purificada de E2 apresentou 2,56 mg de proteínas totais. Destes 2,56 mg de proteínas totais, 2,22 mg eram de hASGRL1. O rendimento da produção foi de, portanto, 0,56 mg/L de expressão de hASRGL1, já que foram feitos 4 L de expressão em E2. Além disso, a pureza da amostra final apresentou melhoras comparado à amostra final de E1. Cerca de 86% das proteínas da amostra eram hASGRL1, sendo que aproximadamente 14% eram contaminantes.

5.2.5. Etapas da Expressão 1 da fração insolúvel do lisado celular (ER1)

O crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) Star atingiu uma D.O._{600nm} média de 0,750 antes da indução com 1 mM de IPTG. Cada etapa do processo de renovelamento da fração insolúvel do lisado celular teve uma alíquota separada para análise em SDS-PAGE (FIGURA 21). A banda de cerca de 44 kDa, correspondente ao dímero processado reduzido, foi identificada em todas as etapas, sugerindo que não houve degradação de hASRGL1 ao longo do renovelamento.

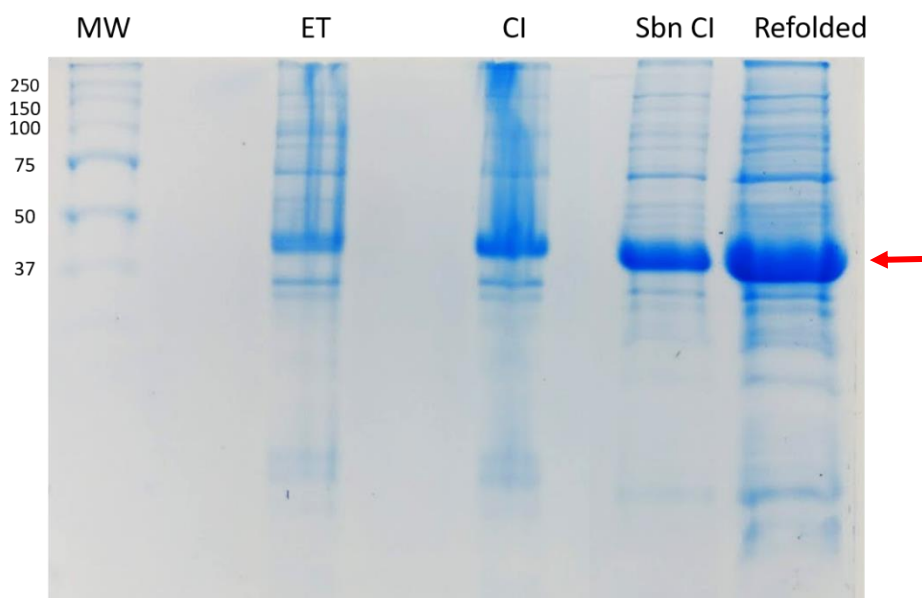


FIGURA 21: SDS-PAGE das etapas do renovelamento de ER1. A seta vermelha indica possível banda de hASRGL1 em 44 kDa. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Legenda: MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad), ET –

extrato total, CI – corpos de inclusão, Sbn CI – sobrenadante dos corpos de inclusão, Refolded – amostra renaturada concentrada

Após lavagem da fração insolúvel do lisado celular com tampão de lavagem, a quantidade de DNA no extrato total diminuiu de 11127,4 ng/μL para 9217,7 ng/μL. A partir da dosagem de proteínas de cada etapa do renovelamento, foi possível identificar a quantidade de proteína que seguiu para as etapas subsequentes (TABELA 1). Cerca de 52% das proteínas do extrato total estavam na fração insolúvel do lisado celular. Foi possível solubilizar 38% dos corpos de inclusão em tampão de solubilização de corpos de inclusão. Por fim, verificou-se que 46% das proteínas contidas nos corpos de inclusão foram solubilizadas para a fração solúvel.

TABELA 1: Dosagem de proteínas das etapas do renovelamento de ER1

Etapas do renovelamento	Concentração de proteínas (mg/mL)	Quantidade total de proteínas (mg)
ET	88,69	3902,36
SBN ET	43,56	1916,64
CI	126,00	756,00
SBN CI	50,86	305,16
Refolded	N/A*	N/A*

Legenda: ET – Extrato total, SBN ET – Sobrenadante do extrato total (fração solúvel), CI – Corpos de Inclusão, SBN CI – Sobrenadante dos corpos de inclusão, Refolded – amostra renaturada concentrada, N/A – não disponível *valor negativo na dosagem

5.2.6. Purificações a partir de ER1

5.2.6.1. Cromatografia por troca aniônica (ER1)

A amostra renaturada concentrada de 16 mL foi submetida a cromatografia de troca aniônica com coluna HiTrap 5 mL. Foram identificados três picos de absorbância no cromatograma (FIGURA 22a) com possível presença de hASRGL1, sendo que as frações correspondentes ao primeiro pico (38-41) (49% de tampão G, 490 mM de NaCl) apresentaram bandas mais proeminentes do que o 2º e 3º picos (50-77)

(FIGURA 22b). O 2º pico saiu em 58,3% de tampão G, ou 583 mM de NaCl, e 3º pico em 70,4% de tampão G, ou 704 mM de NaCl. Quando juntados, foi feita uma média ponderada da concentração de NaCl em cada fração de 55-77, dando uma média de 680 mM de NaCl.

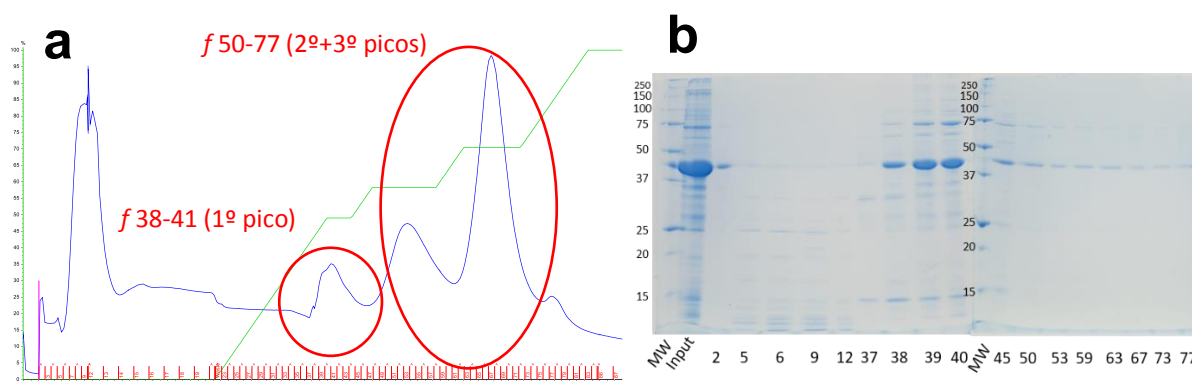


FIGURA 22: Cromatografia de troca aniônica de hASRGL1 em ER1. **a)** Cromatograma ampliado no pico de eluição. Em círculos vermelhos, os picos nos quais infere-se a presença de hASRGL1. **b)** SDS-PAGE das frações 2-77. Geis corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Legenda: MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad), 2-12 – *Flow Through*, 37-77 – frações da cromatografia de troca aniônica

5.2.6.2. Cromatografia de afinidade (ER1)

As frações 38-41 (primeiro pico do cromatograma da FIGURA 22a) da troca aniônica foram concentradas até 500 µL e submetidas a cromatografia de afinidade utilizando a coluna HisTrap HP 1 mL. Foi identificado um pico de absorvância sobreposto ao pico de absorvância crescente (FIGURA 23a), no qual, por meio do SDS-PAGE (FIGURA 23b), verificou-se possível presença de hASRGL1. As frações 11-14 foram selecionadas para dosagem de proteínas.

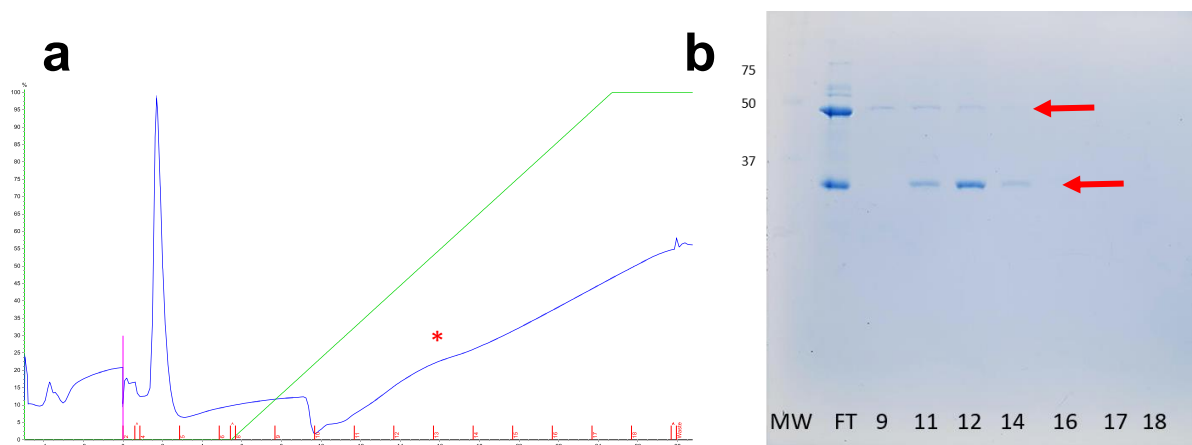


FIGURA 23: Cromatografia de afinidade de hASRGL1 em ER1. **a)** Cromatograma ampliado nos picos de eluição. Em asterisco vermelho, o pico no qual infere-se a presença de hASRGL1. **b)** SDS-PAGE das frações 9-18 da cromatografia de afinidade. Em seta vermelha, bandas com possível presença de hASRGL1. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Legenda: MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad), FT – *Flow Through*, 9-18 - frações da cromatografia de afinidade.

A amostra final purificada de ER1 (frações 11-14 da afinidade) apresentou 0,528 mg de proteína. A produção foi de, portanto, 0,264 mg/L de expressão, considerando que foram feitos 2 L de expressão de hASRGL1 em ER1.

5.2.7. Etapas da Expressão 2 da fração insolúvel do lisado celular (ER2)

O crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) Star atingiu uma D.O._{600nm} média de 0,662 antes da indução com 1 mM de IPTG. As alíquotas de cada etapa do renovelamento da fração insolúvel do lisado celular foram analisadas em SDS-PAGE (FIGURA 24). Assim como ER1, a banda de cerca de 44 kDa (dímero processado reduzido) foi identificada em todas as etapas, sugerindo que não houve degradação de hASRGL1 ao longo do renovelamento. Ademais, esta banda não foi identificada na fração solúvel do extrato total (SBN ET), indicando que a proteína de interesse foi, de fato, para a fração insolúvel do lisado celular.

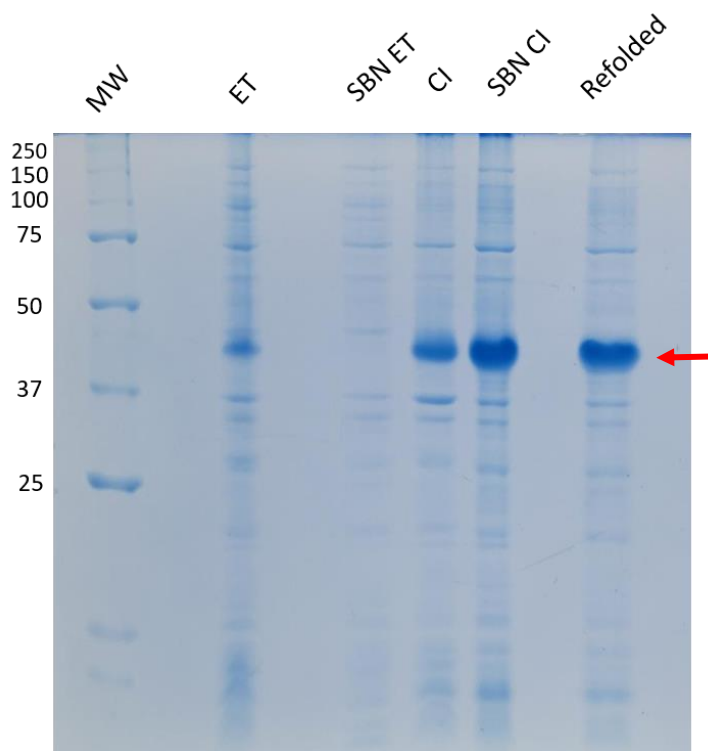


FIGURA 24: SDS-PAGE das etapas do renovelamento de ER2. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Em seta vermelha, banda com possível presença de hASRGL1. Legenda: MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad), ET – extrato total, SBN ET – sobrenadante do extrato total (fração solúvel), CI – corpos de inclusão, SBN CI – Sobrenadante dos corpos de inclusão, Refolded – amostra renaturada concentrada

A quantidade de DNA no extrato total diminuiu de 6150,0 ng/μL para 4259,1 ng/μL após lavagem da fração insolúvel do lisado celular com tampão de lavagem. A partir da dosagem de proteínas de cada etapa do renovelamento, foi possível identificar a quantidade de proteína que seguiu para as etapas subsequentes (TABELA 2). Cerca de 49% das proteínas do extrato total estavam na fração insolúvel do lisado celular. Foi possível solubilizar 53% dos corpos de inclusão em tampão de solubilização de corpos de inclusão. Por fim, verificou-se que 33% das proteínas contidas nos corpos de inclusão foram solubilizadas para a fração solúvel e, deste valor, 54% das proteínas foram renaturadas.

TABELA 2: Dosagem de proteínas das etapas do renovelamento de ER2

Etapas do renovelamento	Concentração de proteínas (mg/mL)	Quantidade total de proteínas (mg)
ET	61,96	2850,16
SBN ET	31,39	1443,94
CI	123,25	739,50
SBN CI	40,17	241,02
Refolded	8,14	130,24

Legenda: ET – Extrato total, SBN ET – Sobrenadante do extrato total (fração solúvel), CI – Corpos de Inclusão, SBN CI – Sobrenadante dos corpos de inclusão, Refolded – amostra renaturada concentrada

5.2.8. Purificações a partir de ER2

5.2.8.1. Cromatografia por troca aniônica

A amostra renaturada concentrada de 8,5 mL foi submetida a cromatografia de troca aniônica com coluna HiTrap 1 mL. O *Flow Through* (FT) da amostra apresentou uma banda de 44 kDa que poderia corresponder ao dímero de cadeia α de hASRGL1. No entanto, o FT não foi selecionado para purificações posteriores devido a quantidade de contaminantes na amostra apresentado no SDS-PAGE (FIGURA 25b). Um pico de absorbância no cromatograma (FIGURA 25a), hASRGL1, correspondente às frações 14-16, apresentaram bandas de 44 kDa de dímero de cadeia α .

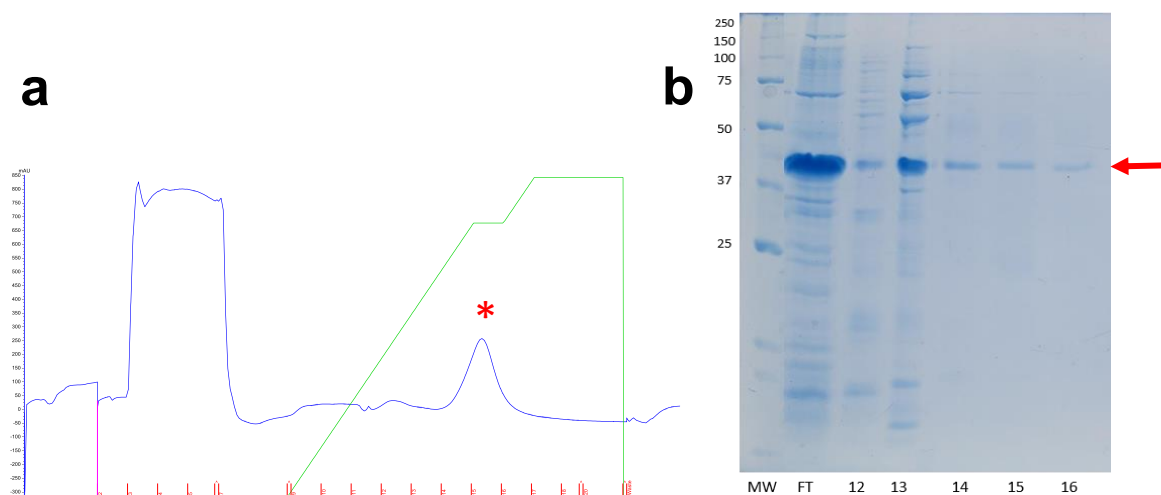


FIGURA 25: Cromatografia de troca aniônica de hASRGL1 em ER2. **a)** Cromatograma ampliado no pico de eluição. Em asterisco vermelho, o pico no qual infere-se a presença de hASRGL1. **b)** SDS-PAGE das frações 12-16. Em seta vermelha, banda com possível presença de hASRGL1. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Legenda: MW – Marcador de peso molecular (*Precision Plus™ Protein Standards Unstained*, BioRad), FT– *Flow Through*, 12-16 – frações da cromatografia de troca aniônica

A amostra final purificada de ER2 (frações 14-16 da troca aniônica) apresentou 0,378 mg de proteína. A produção foi de, portanto, 0,189 mg/L de expressão, considerando que foram feitos 2 L de expressão de hASRGL1 em ER2.

6. DISCUSSÃO

A produção recombinante de hASRGL1 já foi descrita anteriormente em poucos estudos na literatura (NOMME *et al.*, 2012; CANTOR *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2016, KANTE *et al.*, 2018). Nesta monografia, duas estratégias de produção encontradas na literatura sofreram adaptações em parâmetros de expressão e purificação (TABELA 3). O protocolo de Nomme *et al.*, 2012, teve como principais alterações o meio de cultura, o volume da coluna utilizada na cromatografia de afinidade e o volume total de expressão de hASRGL1. Já o protocolo de Kante *et al.*, 2018, sofreu mais adaptações comparado ao protocolo de Nomme, uma vez que o estudo original realizou a produção de hASRGL1 em biorreator. Os parâmetros de produção foram adaptados para uma escala laboratorial, buscando promover a formação de corpos de inclusão.

TABELA 3: Parâmetros alterados a partir de protocolos de expressão e purificação de hASRGL1 da literatura

REFERÊNCIA	PARÂMETROS ORIGINAIS	PARÂMETROS ALTERADOS
NOMME <i>et al.</i> (2012)	• 2 L de produção em meio 2YT • Vetor de expressão pET14b-SUMO	• 4 L de produção em meio LB • Vetor de expressão pET28a-TEV

	• Coluna HisTrap HP 5 mL • 250 mM de imidazol na eluição de hASRGL1	• Coluna HisTrap HP 1 mL • 125 mM de imidazol na eluição de hASRGL1
KANTE et al. (2018)	• Biorreator de 5 L (<i>working volume</i> de 3 L) em meio personalizado • BL21 (DE3) pLysS • <i>Screening</i> de condições ótimas de lise (volume de tampão de lise e tempo de pulsos de sonicação), renovelamento (pH, temperatura, molaridade de ureia) • Uma etapa de cromatografia de troca aniônica • Coluna BPG™ XK 16/20 (GE Healthcare) com matriz SP-Sepharose FF	• 2 L de produção em <i>Fernbach</i> com meio LB • BL21 (DE3) Star • Uso apenas de condições ótimas de lise (10 mL de tampão de lise por g de <i>pellet</i>, e 11 s de pulsos de sonicação), renovelamento (pH 8,5, 25°C e ureia 8 M) • Uma etapa de cromatografia de troca aniônica seguida de cromatografia de afinidade • Colunas HiTrap Q HP 1 mL e 5 mL

O meio LB é amplamente utilizado em protocolos de produção de DNA plasmidial e expressão de proteínas recombinantes (SAMBROOK & RUSSELL, 2011), tornando-o adequado para cultivo de *E. coli* em ambas as estratégias de produção. A cepa BL21 (DE3) Star possui a mutação *rne131*, codificando uma RNAase truncada, permitindo aumento da estabilidade de mRNA e, conseqüentemente, da capacidade de expressão na bactéria. Esses fatores foram decisivos para realizar as adaptações nos protocolos.

Expressões utilizando o protocolo adaptado de Nomme *et al.*, 2012, apresentaram maior rendimento e pureza do que a adaptação de Kante *et al.*, 2018. Protocolos de renovelamento têm sido utilizados pois, apesar de, em geral, ser indesejável a obtenção de proteínas em corpos de inclusão, estes apresentam vantagens como: homogeneidade de proteínas, fácil isolamento, resistência a proteínas proteolíticas, processamento *down-stream* barateado (KAUR *et al.*, 2018; CLARK, 1998). No entanto, a obtenção de alto rendimento de proteína depende de fatores como cepa bacteriana, vetor plasmidial, parâmetros de cultivo e purificação. Além disso, atingir uma amostra purificada com proteínas funcionais após o renovelamento depende das condições de renaturação como agente caotrópico, temperatura e arranjo da estrutura terciária da proteína (YAMAGUCHI & MIYAZAKI, 2014).

O rendimento do protocolo adaptado de Nomme *et al.*, 2012 (0,56 mg/L de expressão), foi cerca de 2 vezes maior comparado ao protocolo adaptado de renovelamento (0,26 mg/L de expressão) (TABELA 4). Vale ressaltar que os autores do estudo original de Kante *et al.*, 2018, utilizaram parâmetros de produção específicos para biorreatores, diferindo do rendimento obtido pelo estudo original. As adaptações feitas neste trabalho visaram adaptar as condições do trabalho original em escala laboratorial.

TABELA 4: Rendimentos de hASRGL1 obtidos no presente estudo

Referência	Quantidade final de proteína produzida (mg)	Rendimento de proteína por litro de expressão (mg/L)
NOMME <i>et al.</i>, 2012	E1: 0,00648	E1: 0,00162
	E2: 2,22	E2: 0,56
KANTE <i>et al.</i>, 2018	ER1: 756 (CI)	ER1: 0,264
	305 (SBN CI)	ER2: 0,189
	N/A (<i>refolded</i>)	
	0,528 (amostra final)	
	ER2: 740 (CI)	
	241 (SBN CI)	

130 (*refolded*)

0,378 (amostra final)

Legenda: E1 - Expressão 1 da fração solúvel do lisado celular, E2 - Expressão 2 da fração solúvel do lisado celular, ER1 - Expressão 1 da fração insolúvel do lisado celular, ER2 - Expressão 2 da fração insolúvel do lisado celular, CI – corpos de inclusão, SBN CI – sobrenadante dos corpos de inclusão (proteína solubilizada), *Refolded* – proteína renaturada

O fato de hASRGL1 ter sido encontrada processada no *Western Blot* em E2 é promissor, uma vez que foram observadas bandas de 44 kDa e 15 kDa, mostrando que a proteína está funcional e ativa. Somado a isso, o volume de eluição das frações selecionadas na SEC de E2 corresponde ao peso molecular das bandas reveladas no *Western Blot*. Em E1, o *Western Blot* revelou uma banda de cerca de 66 kDa que poderia corresponder ao dímero não-processado reduzido ou trímero processado reduzido, visto que ambos têm pesos moleculares similares. Em ambos os casos, a proteína alvo foi encontrada nas amostras finais purificadas.

O rendimento de hASRGL1 em E1 foi menor do que E2. Possivelmente isso se deve ao fato de que, em E1, o uso de uma coluna de 5 mL pode ter tornado mais propensa a ligação não-específica de contaminantes na resina, corroborado pela maior dosagem de proteínas totais em E1 (3,11 mg) em relação a E2 (2,56 mg). Por isso, foi escolhida uma coluna de 1 mL para a cromatografia de afinidade de E2, uma vez que, seguindo o princípio da técnica, se a resina da coluna estiver saturada com a proteína alvo, haverá menos interação entre a resina e proteínas não-específicas (DANIELSSON, 2018). Tal observação refletiu no aumento da pureza da amostra em E2 (86%) frente a E1 (21%). O aumento da pureza da amostra de E2 observado no SDS-PAGE (FIGURA 18) mostrou que tal mudança foi efetiva em diminuir a quantidade de contaminantes da amostra.

Vale ressaltar que a quantificação de proteínas por meio do programa GelAnalyser é um método limitado, uma vez que depende apenas da intensidade das bandas coradas no gel. Tal método foi utilizado a fim de estimar a quantidade de hASRGL1 nas bandas dos SDS-PAGE das amostras finais purificadas. Metodologias espectrométricas são mais precisas para quantificação de proteínas específicas em uma amostra, como HPLC (do inglês, *High Precision Liquid Chromatography*) (HUSSAIN *et al.*, 2019).

Diferenças na concentração de imidazol necessária para eluir hASRGL1 em E1 (73,5-166 mM) e E2 (125 mM) podem ter se dado devido ao uso de colunas de diferentes volumes (5 mL e 1 mL respectivamente). Por isso, o perfil de separação de proteínas no cromatogramas foi diferente entre E1 e E2. De forma semelhante, a diferença do perfil de separação de proteínas nas cromatografias de troca aniônica de ER1 e ER2 pode ter se dado devido ao uso de colunas de volumes diferentes. Assim como em E1 e E2, em ER1 foi utilizada uma coluna de 5 mL, o que pode ter causado uma maior separação de picos de absorbância, comparado ao cromatograma de ER2 (FIGURA 25).

A presença de diferentes perfis de oligomerização e processamento de hASRGL1 entre E1 e E2 pode ter se dado pelo uso de colunas de cromatografia de afinidade de volumes diferentes. Ademais, sabe-se que diferenças na taxa de processamento de hASRGL1 podem estar associadas a variações de fatores no meio, como presença de glicina (SU *et al.*, 2013). Sabe-se também que existe uma mistura de hASRGL1 ativa e inativa no meio, sendo alcançado no máximo 50% da enzima processada (CANTOR *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012).

Idealmente, um método de produção de hASRGL1 recombinante consistiria em um protocolo com menos etapas possíveis, resultando em alto rendimento e pureza da proteína alvo. Desta forma, um método ideal resultaria em barateamento do processamento *down-stream* da proteína. Tendo em vista que cada proteína apresenta propriedades bioquímicas, biofísicas e funcionais diferentes, é necessário desenhar protocolos de produção personalizados para cada proteína. Baseado nos princípios de um método de produção ideal citados acima, estudos buscam otimizar ao máximo a produção de proteína por meio de alterações de parâmetros de expressão e purificação (FRANCIS & PAGE, 2010).

A partir dos resultados expostos, uma possibilidade de método de produção de hASRGL1 que se aproxime do ideal uniria ambos os protocolos a fim de aumentar o rendimento final de hASRGL1 em escala laboratorial. Ao juntar as amostras finais purificadas de cada protocolo, se obteria mais proteína alvo do que apenas utilizando cada metodologia separadamente. Em escala laboratorial, este estudo verificou que ambas as metodologias de produção são praticáveis. Portanto, juntar os protocolos adaptados aqui estabelecidos levaria a um aumento considerável do rendimento, comparado a utilizar os protocolos individualmente.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, foi possível compreender parâmetros de expressão e purificação em torno da produção de hASRGL1, abrindo caminho para estudos estruturais e funcionais acerca da enzima. As conclusões deste estudo podem ser detalhas nos pontos a seguir:

- Alterações em protocolo de purificação a partir da fração solúvel do lisado celular foram eficientes em aumentar a pureza e rendimento da amostra de hASRGL1 ao longo das produções dos protocolos adaptados;
- O protocolo de produção a partir da fração solúvel do lisado celular obteve hASRGL1 na forma processada;
- O uso de coluna de afinidade HisTrap HP de 1 mL no protocolo de produção a partir da fração solúvel do lisado celular permitiu um aumento da pureza da amostra em escala laboratorial;
- A purificação a partir da fração insolúvel do lisado celular é uma alternativa factível para produção recombinante de hASGRL1;
- O rendimento de protocolo adaptado da literatura a partir da fração solúvel do lisado celular foi maior do que do protocolo adaptado usando a fração insolúvel do lisado celular;
- A junção das amostras finais dos protocolos adaptados a partir das frações solúvel e insolúvel do lisado celular é uma possibilidade para aumento do rendimento de hASRGL1.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K. et al. Cellular and molecular immunology, ed 5, Philadelphia, 2004.

Affinity Chromatography. Science Direct. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/affinity-chromatography>> Acesso em: Junho de 2019.

ALLEMANI, C. et al. CONCORD Working Group. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). **Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 977-1010, 2015.

AMYLON, M.D.; SHUSTER, J.; PULLEN, J. *et al.* Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. **Leukemia**, v.13, p. 335–342, 1999.

ASWAD, D.W., PARANANDI, M.V., SCHURTER, B.T. Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 21, p. 1129–1136, 2000.

AVRAMIS, V. I. Asparaginases: Biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer Research**, v. 32, n. 7, p. 2423–2437, 2012.

BÖHME, L. *et al.* Isoaspartate residues dramatically influence substrate recognition and turnover by proteases. **Biological Chemistry**, v. 389, n. 8, p. 1043–1053, 2008.

BRANNIGAN, J. A. *et al.* A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. **Nature**, v. 378, n. January 2015, p. 416–419, 1995.

CANTOR, J. R. *et al.* The Human Asparaginase-Like Protein 1 hASRGL1 is an Ntn-Hydrolase with β -aspartyl Peptidase Activity. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 11025–11031, 2009.

CHANG, J. E. *et al.* Augmented and standard BFM chemotherapy for treatment of adult ALL. **Leuk Lymphoma**, v. 49, n. 12, p. 2298–2307, 2008.

CHIARETTI, S.; ZINI, G.; BASSAN, R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, 2014.

CLARKE, R. T. *et al.* Clinical presentation of childhood leukaemia: A systematic review and meta-analysis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 101, n. 10, p. 894–901, 2016.

CLARK E. D. B. Refolding of recombinant proteins. **Curr Opin Biotechnol.** v. 9, n. 2, p. 157–163, 1998.

COOK, S. N. *et al.* Infant Cancers in California, 1988-2011. Sacramento, CA: California **Cancer Reporting and Epidemiologic Surveillance (CalCARES) Program**, Institute for Population Health Improvement, University of California Davis Health System, July 2014.

COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **Northern clinics of Istanbul**, vol. 3, n. 2, p. 156-160, 2016.

CRONAN, J. E. Escherichia coli as an Experimental Organism. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–7, 2006.

DANIELSSON, Å. Affinity Chromatography. **Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes**, v. 1286, p. 367–378, 2018.

DINGERMAN, T. Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and

challenges. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 90–97, 2008.

EVTIMOVA, V. et al. Identification of CRASH, a gene deregulated in gynecological tumors. **International Journal of Oncology**, v. 24, n. 1, p. 33–41, 2004.

FEKETE, S. et al. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 161–173, 2014.

FRANCIS, D. M., PAGE, R. Strategies to Optimize Protein Expression in E. coli. **Current Protocols in Protein Science**, v. 5, n. 24. p. 1–5, 2010

GILBERT, W. et al. Expression in Escherichia coli of a Chemically Synthesized Gene for the Hormone Somatostatin. **Science**, v. 198, n. 6, 1977.

HOWLADER, N. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011. Bethesda, MD: **National Cancer Institute**. 2014. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2011/> . Acesso em: Junho de 2019.

HUSSAIN, M., FORBES, N., & PERRIE, Y. Comparative Analysis of Protein Quantification Methods for the Rapid Determination of Protein Loading in Liposomal Formulations. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 1, p. 39, 2019

HUTTER, J. J. Childhood Leukemia Abbreviations : **Pediatrics in Review**, v. 31, n. 6, p. 234–241, 2015.

INCA. Acute leukemia in childhood and adolescence. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 47, n. 3, p. 245–257, 2001.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: Abril de 2020.

INSTITUTO ONCOGUIA. Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda (LLA) em Crianças. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamento-da-leucemia-linfoide-aguda-lla-em-criancas/3914/603/>>. Acesso em Junho de 2019.

KANTE, R. K. et al. Optimized upstream and downstream process conditions for the improved production of recombinant human asparaginase (rhASP) from Escherichia coli and its characterization. **Biologicals**, v. 56, p. 45–53, 2018.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, 2018.

LI, B. S. et al. The downregulation of asparagine synthetase expression can increase the sensitivity of cells resistant to L-asparaginase. **Leukemia**, v. 20, n. 12, p. 2199–201, 2006.

LI, W. et al. Uncoupling Intramolecular Processing and Substrate Hydrolysis in the N-terminal Nucleophile Hydrolase hASRGL1 by Circular Permutation. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 11, p. 1840–1847, 2012.

MARIANAYAGAM, N. J.; SUNDE, M.; MATTHEWS, J. M. The power of two: Protein dimerization in biology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 11, p. 618–625, 2004.

METAYER, C. et al. The Childhood Leukemia International Consortium. **Cancer Epidemiology**, v. 37, n. 3, p. 336–347, 2013.

MICHALSKA, K.; JASKÓLSKI, M. Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 4, p. 627–640, 2006.

MOGHRABI, A. et al. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood journal**, v. 109, n. 3, p. 896–905, 2007.

MORAIS, S. B. et al. The role of the quaternary structure in the activation of human L-asparaginase. **Journal of Proteomics**, v. 224, 2020.

MÖRICKE, A. et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected 82 pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. **Blood**, v. 111, n. 9, p. 4477–4489, 2008.

MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Oncology/Hematology**, v. 28, p. 97–113, 1998.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. SEER Cancer statistics review 1975-2000: adolescent and young adult cancer by site incidence, survival and mortality. Disponível em <https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2000/>. Acesso em 7 jun. 2019.

NIC. “A Snapshot of Leukemia”. Disponível em: <<https://web.archive.org/web/20140704183430/http://www.cancer.gov/researchandfunding/snapshots/leukemia>> Acesso em: Junho de 2019.

NOMME, J. et al. Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: Insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. **Biochemistry**, 2012.

PEDROSA, F.; LINS, M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 2, n. 1, p. 63–68, 2006.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 2011.

RICHARDS, N. G. J.; KILBERG, M. S. Asparagine synthetase chemotherapy. **Annual review of biochemistry**, v. 75, p. 629–54, jan. 2006.

ROTH, G. et al. L-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-batch cultures. **Brazilian journal of chemical engineering**, v. 30, n. 2, p. 245–256, 2013.

RYTTING, M. E. Role of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: focus on adult patients. **Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy**, v. 2, p. 117–124, 2012.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, **NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SALZER, W. L. *et al.* Development of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1329, p. 81–92, 2014.

SAMUELSON, J. C. Heterologous Gene Expression in *E. coli*. **Methods in Molecular Biology**, v. 705, p. 195–209, 2011.

SANGHVI, G. *et al.* Mitigation of acrylamide by L-asparaginase from *Bacillus subtilis* KDPS1 and analysis of degradation products by HPLC and HPTLC. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 2016.

UPADHYAY, A. K. *et al.* Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. SEP, p. 1–10, 2014.

WAGNER, S. *et al.* Tuning *Escherichia coli* for membrane. **PNAS**, v. 105, n. 38, p. 14371–14376, 2008.

YAMAGUCHI, H., & MIYAZAKI, M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 235–251, 2014