



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS**

JOÃO MATHEUS FONTELES SILVA

**ABORDAGENS DE EVOLUÇÃO DIRIGIDA PARA AUMENTO DA EFICIÊNCIA
CATALÍTICA DA ENZIMA TERAPÉUTICA L-ASPARAGINASE II DE *Bacillus*
*subtilis***

**FORTALEZA
2025**

JOÃO MATHEUS FONTELES SILVA

ABORDAGENS DE EVOLUÇÃO DIRIGIDA PARA AUMENTO DA EFICIÊNCIA
CATALÍTICA DA ENZIMA TERAPÉUTICA L-ASPARAGINASE II DE *Bacillus subtilis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S58a Silva, João Matheus Fonteles.

Abordagens de evolução dirigida para aumento da eficiência catalítica da enzima terapêutica L-asparaginase II de *Bacillus subtilis* / João Matheus Fonteles Silva. – 2025.
98 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

1. Leucemia linfoide aguda. 2. Biblioteca. 3. Error-prone PCR. 4. Mutantes. I. Título.

CDD 660.6

JOÃO MATHEUS FONTELES SILVA

ABORDAGENS DE EVOLUÇÃO DIRIGIDA PARA AUMENTO DA EFICIÊNCIA
CATALÍTICA DA ENZIMA TERAPÉUTICA L-ASPARAGINASE II DE *Bacillus subtilis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 27/03/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Raphael Trevizani
Fundação Oswaldo Cruz - CE (FIOCRUZ-CE)

A Deus.

A minha família.

À sociedade.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A Deus, por sempre estar comigo me dando força e sabedoria em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Eliete Fonteles de Assis e João Batista dos Santos Silva, por sempre me educarem da melhor forma possível e serem minha inspiração na vida.

A minha noiva, Ana Maria, por estar comigo durante toda a caminhada, proporcionando os melhores momentos, me fazendo sorrir todos os dias e deixando a vida um pouco mais leve.

À Universidade Federal do Ceará , pela formação acadêmica.

À FIOCRUZ - CE, pela infraestrutura cedida na realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado, pela excelente orientação, tempo e recursos dedicados à minha formação, desempenhando com sua função com perfeição e cuidado.

Ao Dr. Marcus Rafael Lobo Bezerra por sempre acompanhar de perto meu trabalho e pelas suas sugestões e conselhos sempre pertinentes.

Aos professores participantes da banca examinadora Dr. Bruno Anderson e Dr. Raphael Trevizani pelo tempo e pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos os familiares e amigos que me acompanharam e me auxiliaram, de diferentes formas nestes dois anos. Em especial, aos meus companheiros de laboratório Lucas, Liandra, Larisse, Maísa, Virgínia, Darlyson, Jucilene, Gabriel e Samuel. Pela amizade e companheirismo ao longo destes dois anos.

Ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Pesquisa e Desenvolvimento da Fiocruz-CE, Rose, Mayara, Marcelo e Camila, por todo o apoio e companheirismo neste percurso.

Aos demais colegas do Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para a Saúde (GEPeSS) e do Grupo de Pesquisa por todo o auxílio e durante o mestrado.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” – José de Alencar.

RESUMO

A L-asparaginase II é uma enzima utilizada em rotinas quimioterápicas no tratamento de Leucemia linfoide aguda. Atualmente, as principais formulações de L-asparaginases (L-ASNases) comerciais são provenientes das bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, porém estão associadas a efeitos colaterais como imunogenicidade, hipersensibilidade e demais efeitos adversos. Assim, faz-se necessário a implementação de técnicas que visem desenvolver L-ASNases com atividade, estabilidade e afinidade melhoradas. A evolução dirigida de proteínas é uma ferramenta que permite a construção de bibliotecas de genes mutantes utilizando técnicas como *error-prone PCR* (*epPCR*) ou recombinação gênica *in vitro*. Quando associada a um método de *screening* eficiente, é possível prospectar os mutantes que apresentem os melhores desempenhos para uma determinada propriedade de interesse e obter uma proteína melhorada. O objetivo desse trabalho é utilizar métodos de evolução dirigida para melhorar a eficiência catalítica da L-asparaginase II de *Bacillus subtilis* (BsAII). A *epPCR* foi realizada para construir três bibliotecas de mutantes do gene *ansZ*, que codifica a L-ASNase, com taxas de mutação distintas. Com base na análise das mutações determinou-se a taxa de mutação mais adequada, de aproximadamente 1 %. Os genes *ansZ* mutantes foram clonados em vetores para expressão constitutiva periplasmáticas, sendo inseridos em células de *E. coli*. Os métodos de *screening* foram divididos em três diferentes etapas, começando com uma seleção em meio sólido, passando por um ensaio enzimático do caldo livre de células pós-expressão e finalizando com testes de atividade asparaginásica e determinação dos parâmetros cinéticos das proteínas recombinantes. Os mutantes selecionados através do método de *screening* nº 1 (BsAII-S1-Mut93) e nº 2 (BsAII-S2-Mut26) foram expressos em vetor pET28a. O rendimento de expressão, a avaliação da atividade e a determinação dos parâmetros cinéticos dos mutantes foram comparados ao da BsAII nativa. A BsAII-S2-Mut26 apresentou um rendimento de expressão 2 vezes maior e atividade asparaginásica e afinidade similares ao da BsAII nativa. Já o BsAII-S1-Mut93 apresentou um rendimento de expressão similar, atividade asparaginásica 5 vezes menor e Constante de Michaelis-Menten (K_M) 3 vezes menor em comparação a BsAII nativa. Embora as técnicas de evolução dirigida mostrem grande potencial para o desenvolvimento de enzimas melhoradas, condições mais eficientes de seleção e rastreamento de mutantes precisam ser padronizadas a fim de obter clones de L-asparaginase II de *Bacillus subtilis* promissores para aplicação terapêuticas.

Palavras-chave: leucemia linfoide aguda; biblioteca ; error-prone PCR; mutantes.

ABSTRACT

L-asparaginase II is an enzyme used in routine chemotherapy for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). Currently, the main commercial formulations of L-asparaginases (L-ASNases) are derived from the bacteria *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*, but they are associated with side effects such as immunogenicity, hypersensitivity and other adverse effects. It is therefore necessary to apply techniques aimed at developing L-ASNases with improved activity, stability and affinity. Directed protein evolution is a tool that allows the construction of mutant gene libraries using techniques such as error-prone PCR (epPCR) or in vitro gene recombination. When combined with an efficient screening method, it is possible to select the mutants with the best performance for a given property of interest and obtain an improved protein. The aim of this work is to use directed evolution methods to improve the catalytic efficiency of L-asparaginase II from *Bacillus subtilis* (BsAII). EpPCR was used to generate three libraries of mutants of the *ansZ* gene encoding L-ASNase with different mutation rates. Based on the analysis of the mutations, the most appropriate mutation rate of approximately 1 % was determined. The mutated *ansZ* genes were cloned into periplasmic constitutive expression vectors and inserted into *E. coli* cells. The screening methods were divided into three different stages, starting with a selection in solid medium, followed by an enzymatic assay of the post-expression cell-free broth, and ending with tests of asparaginase activity and determination of the kinetic parameters of the recombinant proteins. The mutants nº 1 (BsAII-S1-Mut93) and nº 2 (BsAII-S2-Mut26) selected by the screening method were expressed in the pET28a vector. The expression yield, activity evaluation and determination of kinetic parameters of the mutants were compared with those of native BsAII. BsAII-S2-Mut26 showed a 2-fold higher expression yield and similar asparaginase activity and affinity to native BsAII. On the other hand, BsAII-S1-Mut93 showed a similar expression yield, 5-fold lower asparaginase activity and 3-fold lower Michaelis-Menten constant (K_M) compared to native BsAII. Although directed evolution techniques have great potential for the development of improved enzymes, more efficient mutant selection and screening conditions need to be standardised in order to obtain promising *Bacillus subtilis* L-asparaginase II clones for therapeutic applications.

Keywords: acute lymphoid leukemia; library ; error-prone PCR; mutants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classes de enzimas de acordo com as reações que catalisam	23
Figura 2 – Mecanismo de ação das L-asparaginases evidenciando o ataque nucleofílico ao seu substrato L-asparagina com a formação de ácido aspártico.....	26
Figura 3 – Comparação entre as principais características das L-asparaginases bacterianas de tipo I e tipo II.....	27
Figura 4 – Estrutura quaternária tridimensional da L-asparaginase II de <i>E.coli</i>	28
Figura 5 –Ação antineoplásica da L-asparaginase	30
Figura 6 – Esquema simplificado do processo de evolução dirigida <i>in vitro</i> de proteínas	34
Figura 7 – Inserção de randômicas no DNA através da técnica de <i>error-prone PCR</i>	35
Figura 8 – Gel de agarose evidenciando a amplificação dos genes da BsAII por <i>error-prone PCR</i>	53
Figura 9 – Géis de agarose mostrando a PCR de colônias de <i>E. coli</i> transformadas com construções pJET- <i>ansZ</i>	55
Figura 10 – Distribuição das mutações no gene <i>ansZ</i> em cada condição de <i>epPCR</i>	56
Figura 11 – Heatmaps das mutações no gene <i>ansZ</i> para cada condição de <i>epPCR</i>	58
Figura 12 – Frequência de substituições no gene <i>ansZ</i> em cada condição de <i>epPCR</i>	60
Figura 13 – Frequência de nucleotídeos substituídos no gene <i>ansZ</i> em cada condição de <i>epPCR</i>	62
Figura 14 – Colônias da biblioteca de mutantes de BsAII construída a partir da condição 2 da <i>epPCR</i>	65
Figura 15 – Uso do corante azul de bromotimol em meio sólido como método de <i>screening</i> de L-ASNases recombinantes extracelulares.....	66
Figura 16 – Ensaio de atividade enzimática por indoxina das BsAII mutantes selecionados da biblioteca nº 1	67
Figura 17 – Absorbância relativa dos mutantes selecionados da biblioteca nº 1 em relação a BsAII nativa a partir do ensaio da indoxina.....	67
Figura 18 – Efeito do metabolismo da <i>E. coli</i> em meio LB ágar com Azul de Bromotimol ...	69
Figura 19 – Géis de agarose mostrando a PCR de colônia das culturas de <i>E. coli</i> transformadas com gene de BsAII mutante	70
Figura 20 – Géis de poliacrilamida mostrando a expressão intracelular das BsAII recombinantes selecionadas da biblioteca nº 1	72
Figura 21 – Colônias de <i>E. coli</i> transferidas da biblioteca de mutantes de BsAII construída	

a partir da condição 1 da <i>epPCR</i>	73
Figura 22 – Ensaio de Nessler em meio sólido como método de <i>screening</i> de L-ASNases recombinantes extracelulares.....	75
Figura 23 – <i>Screening</i> de mutantes de BsAII em placa utilizando reagente de Nessler para selecionar clones produtores de L-ASNase recombinante extracelular	76
Figura 24 – Ensaio de indoxina dos mutantes de BsAII selecionados da biblioteca nº 2	77
Figura 25 – Gel de agarose evidenciando a amplificação dos genes <i>ansZ</i> por PCR de alta fidelidade	78
Figura 26 – Gel de agarose mostrando a PCR de colônia de <i>E. coli</i> transformadas com gene de BsAII mutante	80
Figura 27 – Gel de poliacrilamida mostrando a expressão intracelular das BsAII recombinantes	82
Figura 28 – Curvas de cinética enzimática da BsAII nativa	84
Figura 29 – Curvas de cinética enzimática da variante BsAII-S2-Mut26.....	84
Figura 30 – Curvas de cinética enzimática da variante BsAII-S1-Mut93.....	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais técnicas de engenharia de proteína.....	33
Quadro 2 – Gene codificador da BsAII (<i>ansZ</i>) e sequência proteica da BsAII.....	42
Quadro 3 – Sequências de primers utilizados nas amplificações por <i>epPCR</i>	43
Quadro 4 – Sequências de primers utilizados nas amplificações por PCR de alta fidelidade.....	47
Quadro 5 – Sequências polipeptídicas, massa molecular, pI teórico e coeficiente de extinção molar das L-ASNases II recombinantes.....	70
Quadro 6 – Sequências polipeptídicas, massa molecular, pI teórico e coeficiente de extinção molar da BsAII nativa e dos mutantes selecionados	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amplificação de <i>ansZ</i> por <i>epPCR</i>	43
Tabela 2 – Amplificação de <i>ansZ</i> por PCR de alta fidelidade.....	48
Tabela 3 – Taxas de mutação no gene <i>ansZ</i> obtidas em cada condição de amplificação por <i>epPCR</i>	63
Tabela 4 – Concentração e atividade enzimática das BsAII recombinantes selecionadas da biblioteca nº 1	72
Tabela 5 – Concentração e atividade enzimática da BsAII nativa e dos mutantes selecionados.....	83
Tabela 6 – Constantes cinéticas da BsAII nativa e dos mutantes BsAII-S1-Mut93 e BsAII- S2-Mut26.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AHA	Ácido β -hidroxamato L-aspártico
Ala	L-alanina
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Asn	L-asparagina
Asp	Ácido L-aspártico
BsAII	L-asparaginase II de <i>Bacillus subtilis</i>
CE	Ceará
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
EC	Enzyme Commission
EcAII	L-asparaginase II de <i>Escherichia coli</i>
epPCR	<i>Error-prone PCR</i>
ErAII	L-asparaginase II de <i>Erwinia chrysanthemi</i>

Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
<i>g</i>	Aceleração gravitacional
<i>g</i>	Grama
GEPeSS	Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para Saúde
Gln	L-glutamina
Glu	Ácido L-glutâmico
<i>h</i>	Hora
kg	Quilograma
K _M	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
L-ASNase	L-asparaginase
LB	Luria-Bertani
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloblastica aguda
M	Molar
mM	Milimolar
μ g	Micrograma

μL	Microlitro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
min	Minuto
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PMFS	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
S	Concentração de substrato
s	Segundo
Ser	L-serina
TCA	Ácido tricloroacético

vv

Thr	L-treonina
Trp	L-triptofano
Tyr	L-tirosina
U	Unidade de atividade
V	Volt
V_0	Velocidade inicial
$V_{MÁX}$	Velocidade máxima

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alpha
β	Beta
CaCl_2	Cloreto de cálcio
$^\circ$	Graus
${}^\circ\text{C}$	Graus Celsius
HCl	Ácido clorídrico
K_2HgI_4	Tetraiodomercurato (II) de potássio
KCl	Cloreto de potássio
®	Marca Registrada
MgCl_2	Cloreto de magnésio
μ	Mi
NaCl	Cloreto de sódio
NH_2	Grupo Amino
NH_3	Amônia
O_2	Oxigênio
$\%$	Porcentagem

vv

TM

Trademark symbol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Leucemia Linfoide Aguda	22
1.2	Enzimas: propriedades e aplicações	23
1.3	L-asparaginases: características funcionais, estruturais e suas aplicações	25
1.4	L-asparaginases no tratamento de leucemia linfoide aguda	29
1.5	Engenharia de proteínas	32
1.6	Evolução dirigida de proteínas	33
2	JUSTIFICATIVA	38
3	HIPÓTESES	40
4	OBJETIVOS.....	41
4.1	Objetivo Geral	41
4.2	Objetivos Específicos	41
5	MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1	Obtenção do material biológico	42
5.2	PCR mutagênica do gene ansZ de <i>B. subtilis</i>	43
5.3	Clonagem gênica em sistema pJET	44
5.4	Transformação das bactérias <i>E. coli</i> quimiocompetentes	44
5.5	Sequenciamento e determinação das taxas de mutação	45
5.6	Construção de uma biblioteca aleatória de mutantes de L-asparaginase	45
5.7	Expressão das proteínas recombinantes em placa deep well	47
5.8	PCR de alta fidelidade do gene da BsAII (ansZ)	47
5.9	Clonagem gênica no vetor pET28a	48
5.10	Expressão das proteínas recombinantes em frascos	49
5.11	Purificação da L-asparaginase recombinante nativa e dos mutantes	50
5.12	Quantificação da atividade enzimática	50
5.13	Cinética enzimática da L-asparaginase recombinante nativa e dos mutantes	51
5.14	Análises eletroforéticas	52
6	RESULTADOS	53
6.1	Amplificação do gene da BsAII por <i>epPCR</i>	53
6.2	Clonagem da gênica da epPCR no vetor pJET	54
6.3	Sequenciamento e análise das mutações	55

6.4	Construção da biblioteca nº 1 de mutantes aleatórios de BsAII	64
6.5	Seleção dos mutantes da biblioteca nº 1 com maior atividade asparaginásica	67
6.6	Clonagem dos mutantes selecionados da biblioteca nº 1 em vetor pET28a ...	69
6.7	Expressão e purificação das BsAII recombinantes da biblioteca nº 1	70
6.8	Quantificação e atividade enzimática das BsAII recombinantes da biblioteca nº 1	72
6.9	Construção da biblioteca nº 2 de mutantes aleatórios de BsAII	73
6.10	Seleção dos mutantes da biblioteca nº 2 com atividade de hidrólise de asparagina	77
6.11	Expressão e purificação da BsAII nativa e dos mutantes selecionados	81
6.12	Quantificação e atividade enzimática da BsAII nativa e dos mutantes	83
6.13	Propriedades cinéticas das BsAII nativa e dos mutantes selecionados	83
7	CONCLUSÃO	87
8	PERSPECTIVAS	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE A – PROTOCOLO MODIFICADO DE PURIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO KIT	97
	APÊNDICE B – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL UTILIZANDO KIT	98
	APÊNDICE C – REAÇÕES ENZIMÁTICAS	99
	APÊNDICE D – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AMÔNIA	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia linfoide aguda

A leucemia linfoide aguda (LLA) é uma neoplasia hematológica rara da medula óssea que ocorre a uma taxa de incidência anual de aproximadamente 1 a 2 por 100.000 pessoas-anos em todo o mundo (KATZ *et al.*, 2015). É um tipo de câncer originário das células brancas do sangue, também conhecidas como leucócitos, caracterizada pela proliferação excessiva de células imaturas de origem linfoide no tecido hematopoietico, comprometendo o funcionamento normal da medula óssea. Possui características específicas de incidência para adultos e crianças, porém a ocorrência é mais comum em crianças (RILEY *et al.*, 2018). A LLA comprehende menos que 1% dos cânceres em adultos, mas representa a malignidade infantil mais comum, sendo responsável por cerca de 25% dos cânceres e 80% de todas as leucemias em crianças. Sua incidência por idade é bimodal, atingindo um pico acentuado entre 1-4 anos e volta a aumentar gradualmente aos 50 anos de idade, em geral, cerca de 40% dos casos anuais da doença ocorrem em adultos (DOUER *et al.*, 2022). O prognóstico da LLA pode ser especialmente ruim nos adultos. Embora a taxa de cura em crianças se aproxime dos 90%, o mesmo nível de sucesso não foi alcançado em adultos (WARTENBERG DANIEL; GROVES FRANK D.; ADELMAN AARON S., 2008). Apesar das taxas de remissão completa superior a 90% com o tratamento inicial de quimioterapia, a taxa de cura da LLA em adultos é de apenas 20-40% (ROWE *et al.*, 2005); a maioria dos indivíduos acaba por sofrer uma recaída, frequentemente no prazo de 1 ano após o diagnóstico, a partir do qual a sobrevivência média é de apenas 4-8 meses (ORIOL *et al.*, 2010).

Clinicamente, as manifestações são divididas em duas grandes classes: primária, onde há o aparecimento de anemias prolongadas, diminuição do número de plaquetas (trombocitopenia) e hipoplásia, e secundária, envolvendo quadros de febre, sangramentos, infecções persistentes e fadiga crônica (MÜLLER H J; BOOS, 1998). O tratamento da LLA é prolongado, variando de dois a três anos. Embora os esquemas terapêuticos possam mudar de centro para centro, os protocolos modernos invariavelmente são constituídos de cinco grandes fases: indução da remissão, intensificação-consolidação, reindução, prevenção da leucemia no sistema nervoso central (SNC) e continuação ou manutenção da remissão. Na indução geralmente são utilizadas três ou quatro drogas: corticóide, vincristine, L-asparaginase e daunoblastina (PEDROSA; LINS, 2002).

As elevadas taxas de sobrevivência em crianças, que representam uma melhoria

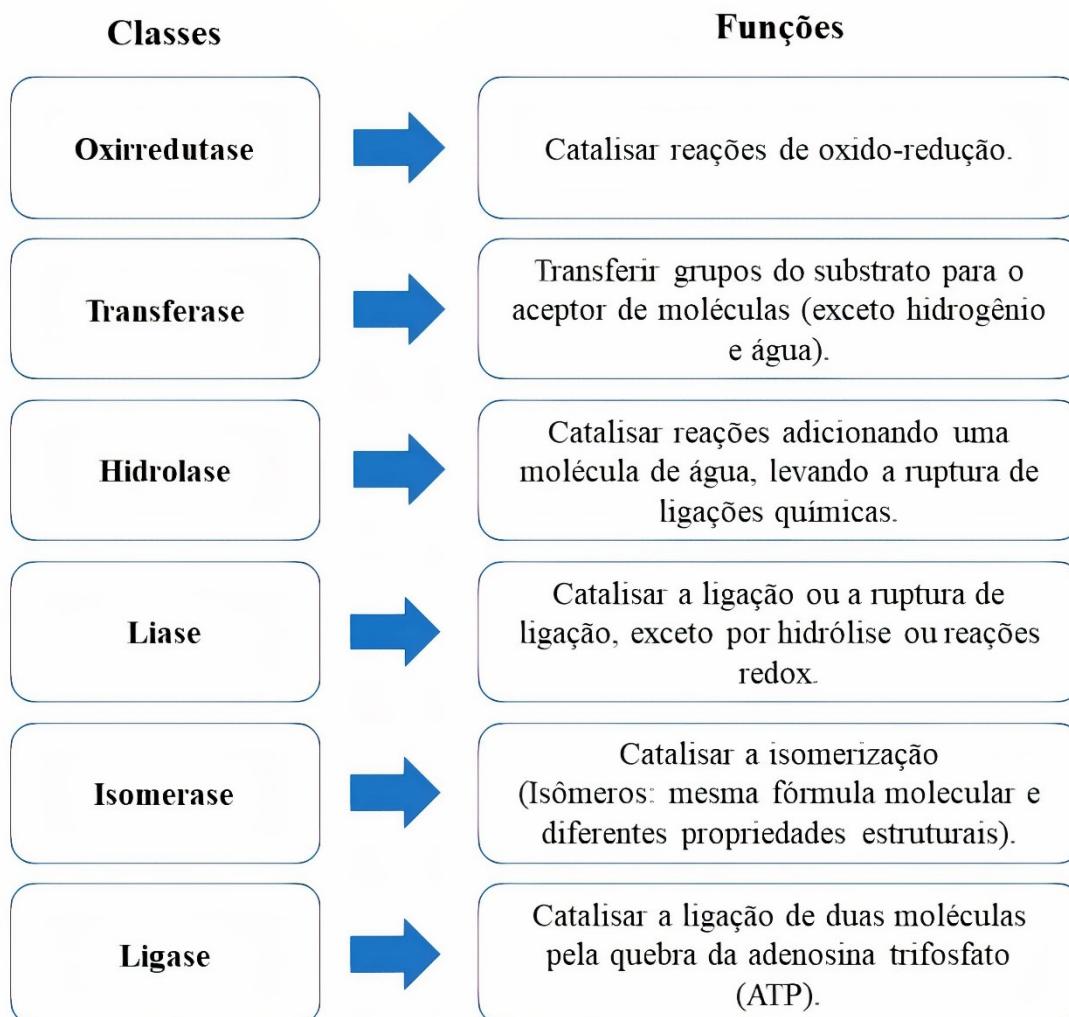
significativa dos resultados pediátricos nos últimos 40 anos, são geralmente atribuídas à utilização de protocolos de tratamentos melhorados e intensificados (PAUL; KANTARJIAN; JABBOUR, 2016). Protocolos pediátricos que são intensivos em asparaginase, estão sendo cada vez mais utilizados em adultos mais jovens, mesmo até aos 50 a 60 anos de idade anos, e têm melhorado essas taxas em comparação com os controles históricos. A utilização intensiva de regimes contendo asparaginase é um fator chave que contribui para os elevados índices de sobrevivência infantil (AMYLON MD *et al.*, 1999; EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016; WETZLER *et al.*, 2007) . Embora os benefícios dos regimes contendo asparaginase não estejam tão bem estudados em adultos em comparação com crianças, os dados disponíveis apoiam a utilização de asparaginase na população.

1.2 Enzimas: propriedades e aplicações

As enzimas são proteínas capazes de catalisar reações metabólicas, permitindo que aconteça em um tempo necessário para manter a vida, sendo consideradas catalisadores naturais (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Essas moléculas reduzem a energia de ativação necessária para uma reação ocorrer sem interferir no equilíbrio da reação catalisada, acelerando o processo, sendo essenciais para manter o metabolismo de todos os seres vivos (TRONO, 2019).

A atividade catalítica das enzimas é dependente da integridade de suas estruturas, podendo haver perda de atividade em caso de desnaturação ou de dissociação de subunidades, para o caso de enzimas multiméricas (NELSON; COX, 2022). As enzimas são atualmente classificadas em 7 classes gerais, com base em sua principal função catalítica, podendo ser oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases ou translocases (MOTTA *et al.*, 2023), como mostrado na Figura 1.

Figura 1 – Classes de enzimas de acordo com as reações que catalisam



Fonte: adaptado de Motta *et al.* (2023). Classes de enzimas e suas respectivas funções.

A utilização de enzimas na indústria é favorável devido a características como atuação em condições brandas de temperatura e pH, reduzindo custos energéticos, biocompatibilidade, biodegradabilidade, e especificidade catalítica, contribuindo para a substituição de catalisadores químicos com potencial perigoso (MORENO *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2021). Além disso, as enzimas não são degradadas ao final de uma catálise, nem reagem irreversivelmente com os substratos, podendo ser utilizadas novamente para a catálise de novos substratos, tendo apenas a estabilidade de cada enzima como limite para este reaproveitamento (KROLL *et al.*, 2023).

Da maioria das enzimas que estão a ser utilizadas industrialmente, mais de metade delas são obtidas a partir de fungos e leveduras, mais de um terço a partir de bactérias e as restantes a partir de fontes animais e vegetais (NIGAM, 2013). Estas biomoléculas têm grande

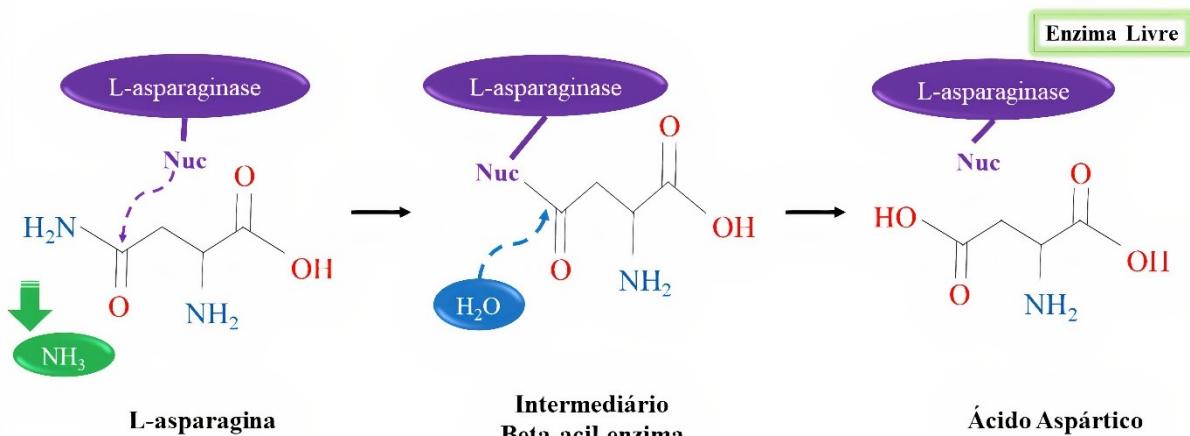
importância devido ao seu uso extensivo em análises bioquímicas e no diagnóstico clínico. Para várias aplicações industriais, as enzimas de origens microbianas são preferidas àquelas de outras fontes porque o seu custo de produção é relativamente menor, as matérias-primas estão facilmente disponíveis e têm uma composição constante, conforme necessário e devido ao rápido crescimento dos microrganismos e a um metabolismo celular bem definido (GOPINATH *et al.*, 2013). Fontes não microbianas, como os tecidos vegetais e animais, contêm ou segregam mais materiais potencialmente perigosos do que os microrganismos. Estes incluem compostos fenólicos, inibidores endógenos e proteases, entre outros, que complicam ainda mais a purificação das enzimas (ANBU *et al.*, 2017). Devido à relação custo-eficácia, ao baixo consumo de energia, ao tempo de processamento reduzido e às características ecológicas, os processos mediados por estas biomoléculas estão rapidamente ganhando popularidade em várias indústrias (LI *et al.*, 2012). A produção de biocatalisadores de origem microbiana é objeto de procura constante, uma vez que estas tem demonstrado desempenhos extraordinários em diferentes setores industriais (ILLANES *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2016). Entretanto, a simples extração de enzimas produzidas naturalmente não supre a quantidade demandada pela maioria dos processos da indústria (TRONO, 2019). Devido a isso, muitas enzimas de uso industrial são produzidas com a utilização da tecnologia do DNA recombinante, que permite a obtenção de resultados de mais rápidos e precisos, aumentando principalmente o nível de produção (NAIR; MARY; YADAV, 2021).

1.3 L-asparaginases: características funcionais, estruturais e suas aplicações

As L-asparaginases (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1, L-ASNase) são enzimas da classe das hidrolases que catalisam a reação de hidrólise do aminoácido L-Asn, produzindo L-aspartato (L-Asp) e amônia (NH_3) (SHRIVASTAVA *et al.*, 2016). O mecanismo do processo de quebra do substrato pela asparaginase ocorre em duas etapas através de um intermediário: beta-acil-enzima. Na primeira etapa, o resíduo nucleofílico da enzima é ativado por uma base forte (NH_2) e, por conseguinte, ataca o átomo de carbono amida da L-Asn, gerando assim o produto intermediário. Na etapa seguinte, um nucleófilo ativado por uma molécula de água ataca o carbono éster ($\text{R}-\text{C}=\text{O}$), finalmente formado o produto ácido L-aspártico, com a liberação de amônia (CACHUMBA *et al.*, 2016). Uma representação esquemática do mecanismo de ação da L-ASNase pode ser visto na Figura 2. Além disso, estas enzimas catalisam outras reações, podendo apresentarem atividade catalítica com outros aminoácidos, como a L-glutamina (L-Gln), a D-asparagina, a D-glutamina e o ácido ácido β -

hidroxamato L-aspártico, porém em níveis inferiores quando comparado a atividade asparaginásica (CACHUMBA *et al.*, 2016; LANVERS *et al.*, 2002; LUBKOWSKI *et al.*, 2020).

Figura 2 – Mecanismo de ação das L-asparaginases evidenciando o ataque nucleofílico ao seu substrato L-asparagina com a formação de ácido aspártico



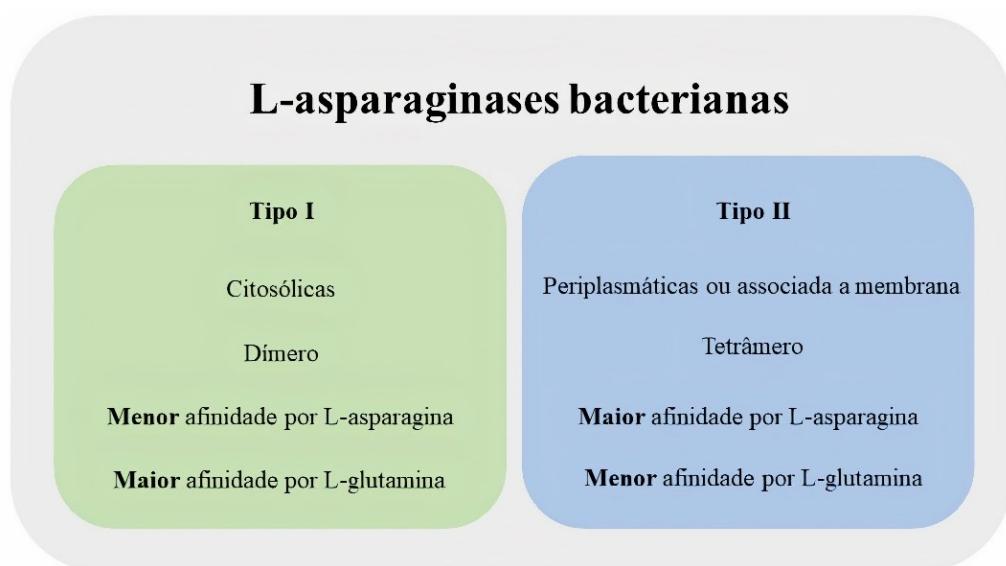
Fonte: adaptado de Shrivastava *et al.* (2016). Mecanismo geral da reação catalisada por L-asparaginase. A seta tracejada indica um ataque nucleofílico.

As L-ASNases estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontrada em animais, plantas e microorganismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (BRUMANO *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2017). Embora sua produção seja observada em diferentes organismos, a principal fonte de síntese de L-asparaginase são os microrganismos, tendo em vista a capacidade de crescer facilmente em substratos muito simples e econômicos (SAVITRI; ASTHANA NEETA; AZMI WAMIK, 2003). Além disso, o processo de produção biotecnológica é geralmente mais simples de otimizar e aumentar a escala do que outros processos. Dependendo da cepa utilizada, esta pode ser modificada geneticamente para aumentar o rendimento, tornando o processo de extração e purificação economicamente viável.

Com base nas suas sequências de aminoácidos, características bioquímicas e homologias estruturais, as L-ASNases são divididas em três grupos, as do tipo vegetal, tipo bacteriana e tipo rizóbia (BATOOL *et al.*, 2016; MÜLLER H J; BOOS, 1998). As L-ASNases de tipo bacteriano são estruturalmente e evolutivamente distintas das de tipo vegetal (CASTRO *et al.*, 2021). As L-ASNases de tipo bacteriana são subdivididas nos tipos I e II com base na sua localização celular e na atividade em relação à L-asparagina e L-glutamina, enquanto a de tipo vegetal é classificada como tipo III (IZADPANAH *et al.*, 2018; JIA *et al.*, 2021). A L-ASNase tipo I é uma enzima citosólica com afinidade relativamente baixa (K_M na faixa

milimolar) para a L-asparagina e uma atividade específica elevada em relação à L-glutamina, apresentando-se na forma de dímeros em sua conformação nativa, com um sítio ativo. Por outro lado, o tipo II é uma L-ASNase periplasmática ou associada à membrana com elevada afinidade para a L-asparagina (K_M na faixa micromolar) e baixa atividade glutaminásica, sendo um homotetrâmero na sua forma nativa, também descrito como um dímero de dímeros contendo quatro sítios ativos (YAO *et al.*, 2005). Com elevada afinidade pelo substrato e uma baixa atividade glutaminásica, as L-ASNases do tipo II apresentam propriedades muito atrativas para aplicações oncológicas (IZADPANAH *et al.*, 2018). Um resumo das principais características das L-asparagiases bacterianas está disposto na Figura 3.

Figura 3 – Comparação entre as principais características das L-asparaginases bacterianas de tipo I e tipo II

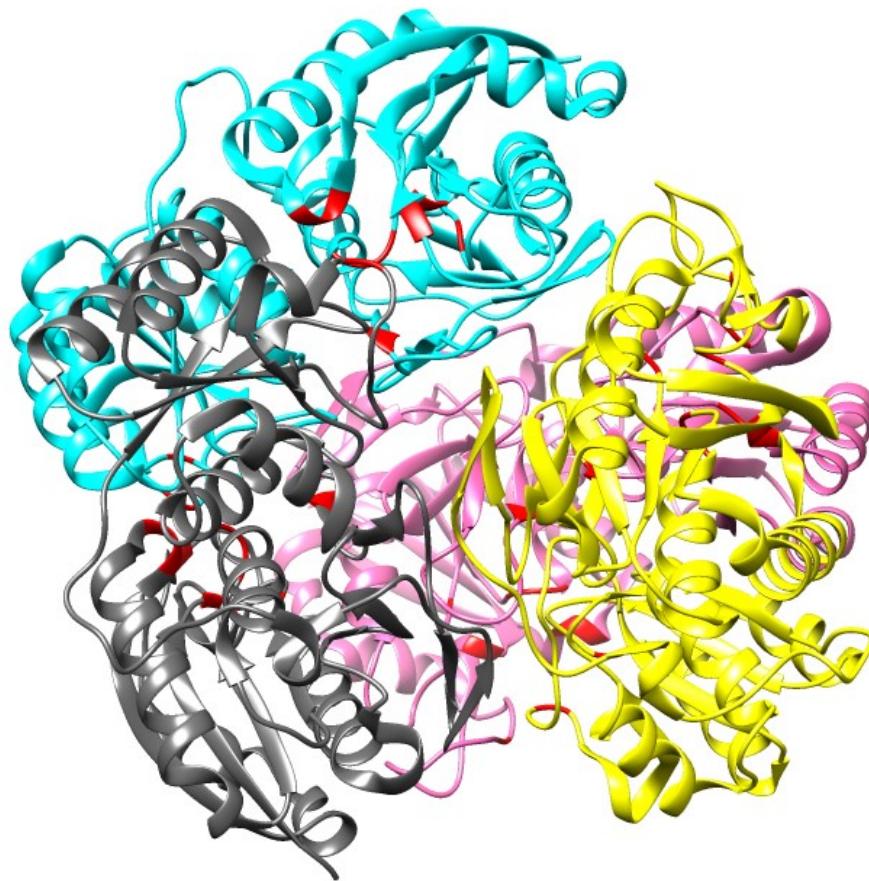


Fonte: adaptado de Castro *et al.* (2021). Características principais das L-asparaginases Tipo I e Tipo II.

As L-ASNases do tipo II são muito estudadas na literatura devido a sua elevada afinidade pelo substrato, sendo usadas como modelo para a elucidação de mecanismos de catálise e em aplicações industriais. Embora o modo de ação das L-ASNases II ainda não tenha sido totalmente elucidado, a obtenção de estruturas moleculares através de difração de raios X em cristais e diversos estudos funcionais foram capazes de estabelecer interações enzima-substrato mais prováveis para essas moléculas e identificar os resíduos de aminoácidos mais importantes para a catálise enzimática (ANISHKIN *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2024). Em 1993, Swain e colaboradores foram capazes de determinar a estrutura da L-asparaginase tipo II de *E. Coli* (EcAII) em alta resolução, detalhando regiões importantes, principalmente o sítio ativo da

enzima. Através de técnicas de co-cristalização, eles determinaram alguns resíduos que fariam parte do sítio ativo (Thr12, Ser58, Gln59, Thr89, Asp90, Ala114 e Glu283) e levantaram a hipótese de que o ataque nucleofílico ao substrato seria feita pelo aminoácido Thr89 (SWAIN *et al.*, 1993). A partir daí, diversos estudos *in vitro* e *in silico*, principalmente com mutantes da EcAII, surgiram para elucidar o funcionamento dessa enzima, que é similar para a maioria das L-ASNases, até descobrirem mais três resíduos importantes para a catálise (Tyr25, Lys162 e Asn248) e o mecanismo de ação dessas enzimas (ANISHKIN *et al.*, 2015; LUBKOWSKI *et al.*, 2020). A Figura 4 mostra a estrutura da L-asparaginase II de *E.coli* e os principais resíduos envolvidos no processo de catálise.

Figura 4 - Estrutura quaternária tridimensional da L-asparaginase II de *E.coli*



Fonte: adaptado de Swain *et al.* (1993). Visualização da estrutura tridimensional da L-ASNase de *E. coli*, com destaque para os monômeros colorizados individualmente em ciano, rosa , amarelo e grafite. Os resíduos envolvidos na catálise enzimática estão demarcados em vermelho em cada monômero (Thr12, Tyr25, Ser58, Gln59, Thr89, Asp90, Ala114 , Lys162, Asn248 e Glu283). Este modelo foi obtido do Protein Data Bank, sob o código de acesso 3ECA, utilizando o software Chimera 1.17.3.

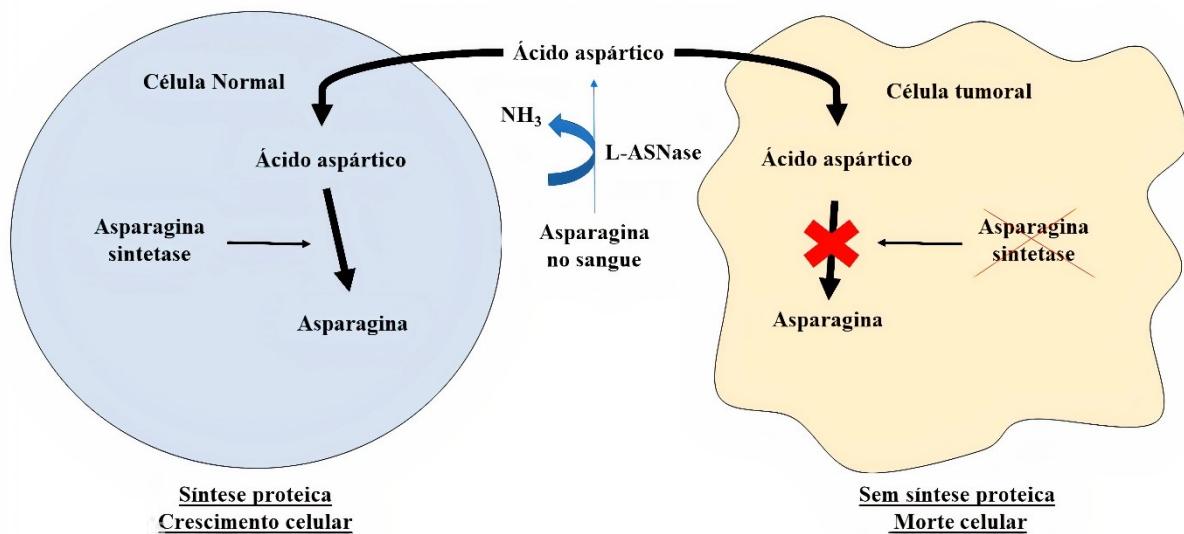
Considerando a reação catalisada pelas L-ASNases, os principais métodos se baseiam na quantificação dos produtos formados na reação, o ácido áspartico (L-asp) e a amônia (NH_3). O método mais utilizado na quantificação da atividade da L-asparaginase é o ensaio colorimétrico de Nessler, que mede a concentração de amônia formada na reação (IMADA A *et al.*, 1973; SHIFRIN; PARROTT; LUBORSKY, 1974). A amônia liberada na reação catalisada pela L-ASNase reage com o tetraiodomercurato (II) de potássio (K_2HgI_4) presente no reagente de Nessler, produzindo uma substância coloidal de cor amarelada cuja absorbância a 436nm pode ser medida em espectrofotômetro. O método de Nessler é muito confiável e ainda é o ensaio mais utilizada para medida de atividade de L-ASNases, no entanto, este ensaio sofre interferência de algumas substâncias, como sais, álcoois e íons metálicos (FREITAS *et al.*, 2019). Isso levou ao desenvolvimento de ensaios alternativos para a medida da atividade das enzimas L-asparaginases (SIMAS *et al.*, 2021). O método do ácido B-hidroxamato L-aspártico (AHA), por exemplo, se baseia em uma reação alternativa catalisada pela L-ASNase, a conversão do ácido β -hidroxamato L-aspártico em asparagina e hidroxilamina, assim como sua reação inversa. O ensaio consiste em incubar a enzima L-ASNase com asparagina, na presença de hidroxilamina, e adicionar cloreto de ferro (FeCl_3) ao final da reação. Os íons de ferro (Fe^{3+}) complexam com o AHA, formando um composto marrom que absorve a 500 nm no espectrofotômetro (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977; GROSSOWICZ *et al.*, 1950). Um outro ensaio enzimático que se baseia na mesma reação é o método da indoxina, que utiliza o AHA como substrato para a catálise da L-ASNase, formando hidroxilamina. É um método bem sensível que consegue quantificar atividades a partir de $2.10^{-5} \text{ U.L}^{-1}$. Uma solução colorimétrica contendo 8-hidroxiquinolina em meio básico é então condensada à hidroxilamina formada na reação anterior, que por meio de uma sequência de oxidações, forma um composto de cor verde chamado de indoxina, que absorve bem a 710 nm (LANVERS *et al.*, 2002). Estudos anteriores mostraram que o método de Nessler fornece uma quantificação mais próxima da atividade da enzima, apesar de superestimar um pouco o valor da atividade enzimática. Por outro lado, os métodos do ácido β -hidroxamato L-aspártico e da Indoxina, embora evite o problema com interferentes que existe no ensaio de Nessler, subestimam o valor da atividade enzimática (MAGRI *et al.*, 2018).

1.4 L-asparaginases no tratamento de leucemia linfoide aguda

A primeira descrição da L-asparaginase foi feita em 1922 (CLEMENTI A., 1922), mas a sua atividade antitumoral só foi reconhecida em 1953 (KIDD, 1953) e somente na década

de 1960 que esta característica foi associada à própria proteína (BROOME J. D., 1963). Finalmente, em 1964 foi demonstrado que a L-asparaginase de *E. coli* (EcA) também era eficaz na regressão de tumores (MASHBURN; WRISTON, 1964). Atualmente, a L-ASNase é amplamente utilizada no tratamento da LLA, leucemia mieloblastica aguda (LMA) e outros tumores malignos linfóides em combinação com outros fármacos (HUSAIN *et al.*, 2016; VALA *et al.*, 2018). Células cancerosas, principalmente de origem linfoide, requerem uma quantidade elevada de L-Asn para um crescimento rápido e maligno. Desta forma, elas necessitam do aminoácido livre no sangue (UENO *et al.*, 1997). No entanto, os linfoblastos leucémicos e algumas outras células tumorais são auxotróficas de L-asparagina e têm um baixo nível da enzima necessária para a síntese do aminoácido. Assim, estas células malignas são dependentes do fornecimento exógeno de L-asparagina do soro sanguíneo para a sua proliferação e sobrevivência (LOMELINO *et al.*, 2017). A atividade antineoplásica resulta da depleção da reserva circulante de L-asparagina pela L-ASNase, que, por sua vez, inibe a síntese proteica, provoca a parada do ciclo celular na fase G1 e, em última análise, a apoptose em células leucémicas suscetíveis (KEATING *et al.*, 1993; LEE; WROBLE; ROSS, 1989). No entanto, as células saudáveis não são afetadas, porque são capazes de produzir asparagina utilizando a L-asparagina sintetase presente em quantidades suficientes (KILLANDER *et al.*, 1976; KOTZIA; LAPPA; LABROU, 2007). Um representação simplificada do mecanismo de ação da L-asparaginase como agente antineoplásico pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 - Ação antineoplásica da L-asparaginase



Fonte: adaptado de Batool *et al.* (2016). Células normais sintetizam asparagina de ácido aspartato intracelular por meio da asparagina sintetase. Devido a falta de asparagina sintetase nas células tumorais, elas dependem exclusivamente da asparagina no sangue para sobreviver, levando a apoptose dessas células no tratamento com L-

asparaginase.

A LLA e outros tumores malignos linfóides têm sido tratados eficazmente com asparaginase há muitos anos. A atividade antileucêmica das L-ASNases depende dos seguintes fatores: a taxa de hidrólise e do K_M (constante de Michaelis) da asparaginase; os fatores farmacológicos da depuração sérica da enzima (AVRAMIS *et al.*, 2004), o desenvolvimento de resistência à asparaginase em células tumorais (AVRAMIS *et al.*, 2002), o desenvolvimento de anticorpos anti-asparaginase pelo sistema imunitário do hospedeiro (DOUER *et al.*, 2007; PANOSYAN *et al.*, 2004), o aumento da contribuição da asparagina oriunda da biossíntese “*de novo*” de asparagina no fígado ou da ingestão de nutrientes (AVRAMIS VASSILIOS ; TIWARI NIDHI PRAKASH, 2006). Além disso, a utilização da L-asparaginase como agente terapêutico série de efeitos secundários, como alergias, anomalias na coagulação, diabetes, pancreatite, desenvolvimento de respostas imunitárias e, finalmente, o choque anafilático, que pode ser grave e pôr a vida em risco (MASHBURN; WRISTON , 1964; MOOLA *et al.*, 1994). Esta série de efeitos adversos possivelmente se deve a atividade glutaminásica da L-ASNase, que hidrolisa a L-glutamina em ácido L-glutâmico e amônia e, portanto, o desenvolvimento de L-ASNases com atividade glutaminásica reduzida é primordial.

As L-ASNases II mais conhecidas são as de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (ErA), que são amplamente utilizadas como quimioterápicos no tratamento de doenças linfoproliferativas e linfomas (PIETERS *et al.*, 2011). Atualmente, estão disponíveis três diferentes formulações de L-ASNase terapêutica: a L-asparaginase nativa (L-ASP, Elspar®, Arginase® e Leuginase®), a forma peguilada (PEG-ASP), a forma conjugada com polietilenoglicol (Oncaspar®), todas derivadas de *E. coli*, e a Erwinia-ASP (Erwinase®), oriundas de estirpes bacterianas de *Erwinia chrysanthem* (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016). Outra L-ASNase do tipo II que vêm se destacando também é a L-asparaginase II de *Bacillus subtilis* por apresentar condições de atuação similaridades com a enzima de *E. coli*, embora apresente uma afinidade mais baixa pela L-asparagina (ONISHI *et al.*, 2015). A principal limitação para o uso continuado de L-asparaginase são as reações de hipersensibilidade com o consequente desenvolvimento de anticorpos anti-asparaginase e redução da atividade enzimática da L-ASNase. As reações imunitárias podem ser divididas em hipersensibilidade clínica, com reações alérgicas que vão desde o eritema localizado até à anafilaxia e hipersensibilidade subclínica (VAN DER SLUIS *et al.*, 2016), com a ocorrência de anticorpos neutralizantes e redução da atividade da asparaginase, na ausência de sinais clínicos (AVRAMIS VASSILIOS I *et al.*, 2009; SHRIVASTAVA *et al.*, 2016). A melhor formulação

e dosagem possível de asparaginases ainda é discutido, apesar da sua utilização como um fármaco vital em todos os protocolos de tratamento da LLA.

1.5 Engenharia de proteínas

A maior parte das proteínas disponíveis naturalmente são incompetentes para desenvolvimento como candidatos promissores para uso industrial ou clínico porque não têm uma atividade catalítica ótima, estabilidade a longo prazo, termoestabilidade, especificidade do substrato, etc. Nesse contexto, técnicas de engenharia de proteínas tem demonstrado um grande potencial no desenvolvimento de macromoléculas com novas propriedades e aplicações biológicas (BERGESON; ALPER, 2024). Com os avanços das técnicas de manipulação gênica, há atualmente condições de se alterar os genes que codificam estruturas macromoleculares, permitindo a manipulação de algumas funções específicas, como estabilidade térmica, maior eficiência catalítica, menor imunogenicidade, maior afinidade e especificada por um ligante, entre outras (CHERRY; FIDANTSEF, 2003; LUTZ, 2010). Dessa forma, uma técnica clássica muito utilizada envolve a utilização de mutagênese sítio dirigida, que possibilita fazer mutações pontuais específicas no gene de interesse, alterando a sequências de aminoácidos de uma determinada proteína. Tais mutações podem estar associadas a alterações de alguma propriedade funcional ou bioquímica da proteína, ou mesmo serem utilizadas a fim de se estudar a função de um aminoácido específico (SONG *et al.*, 2023). Essa abordagem, chamada de desenho racional, está quase sempre associada a estudos computacionais, como *docking* e dinâmica molecular, com o intuito de inferir “*hot spots*”, ou seja, aminoácidos chaves para uma determinada propriedade ou função. Uma desvantagem desta abordagem, está na necessidade de conhecimento prévio da estrutura tridimensional, associado ao tempo despendido e custo computacional das análises (YANG *et al.*, 2015).

Assim, novas técnicas foram sendo desenvolvidas, as quais permitem uma rápida modificação da proteína através da seleção das características de interesse. A evolução molecular *in vitro* ou evolução dirigida, tem se desenvolvido muito na última década, permitindo modificar sequências de aminoácidos para criar novas proteínas com propriedades evoluídas. Aplicando os conceitos da seleção natural darwiniana às moléculas biológicas, uma biblioteca de genes com mutações aleatórias pode ser submetida a uma pressão seletiva, distinguindo assim os mutantes viáveis dos inviáveis, para uma dada propriedade que se deseja “melhorar”, sendo uma estratégia muito inovadora (COBB; CHAO; ZHAO, 2013). Um resumo das principais técnicas de engenharia de proteínas pode ser visto no Quadro 1.

Quadro 1 – Principais técnicas de engenharia de proteínas

Técnicas	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Desenho Racional	Uma estratégia que utiliza o conhecimento da estrutura da proteína para gerar mutações específicas e melhorar seu desempenho. As mutações podem ser geradas através de mutagênese sítio dirigida ou síntese.	Gera uma pequena biblioteca para <i>screening</i> .	Necessita de um conhecimento prévio da estrutura da proteína.
Evolução dirigida	Um método que mimetiza a evolução natural para melhorar o desempenho da proteína. Este método pode ser realizado utilizando mutagênese aleatória, mutagênese de saturação, embaralhamento de genes, etc.	Não necessita de nenhum conhecimento da estrutura da proteína.	Gera uma ampla biblioteca para <i>screening</i> .
Desenho semi-racional	Uma técnica que combina métodos computacionais do desenho racional e abordagens de evolução <i>in vitro</i> para contornar as limitações de ambas as técnicas e melhorar o desempenho da proteína. Este método pode ser realizado utilizando mutagênese aleatória, mutagênese de saturação, embaralhamento de genes, etc.	Não necessita de um conhecimento aprofundado da estrutura da proteína	Pode gerar uma ampla biblioteca para <i>screening</i> .
Métodos computacionais e desenho “ <i>de novo</i> ”	Métodos que podem ser utilizados em combinação com outras técnicas, combinando dados estruturais e de sequência para modelar mutações benéficas em proteínas existentes ou para obter novas proteínas <i>in silico</i> .	Menor trabalho laboratorial para construir a biblioteca e realizar o <i>screening</i> dos mutantes.	Pode exigir grande poder computacional. Necessita de um conhecimento prévio da estrutura da proteína.

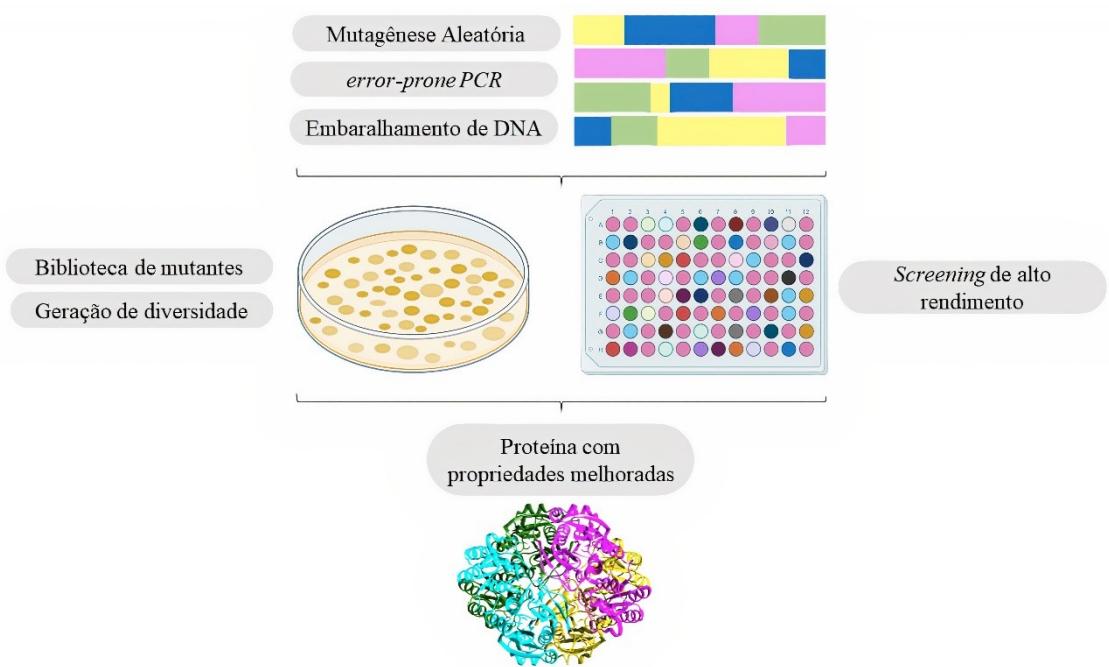
Fonte: adaptado de Bergeson *et al.* (2024). Técnicas de engenharia de proteína e suas vantagens e desvantagens.

1.6 Evolução dirigida de proteínas

A estratégia de evolução dirigida foi desenvolvida na década de 1990 (ARNOLD, 1996). A evolução dirigida mimetiza *in vitro* o processo da seleção darwiniana e pode ser definida como um processo no qual uma classe de determinados agentes (drogas, anticorpos, enzimas, etc.) com o melhor desempenho para uma determinada característica é gerada e selecionada (BLOOM; ARNOLD, 2009). Ao longo de 30 anos de desenvolvimento, a estratégia de evolução dirigida tem sido aplicada com êxito para modificar as propriedades das enzimas tais como a atividade, a estabilidade, a especificidade pelo substrato e a estereoselectividade (ARNOLD, 2018; COBB; CHAO; ZHAO, 2013). Esta técnica geralmente começa com a

construção de uma biblioteca de genes mutantes, que serão submetidos a um processo de seleção eficiente e os que mostrarem melhor desempenho para determinada propriedade de interesse são identificados, isolados e submetidos a novos ciclos de mutagênese e seleção, objetivando um acúmulo de mutações favoráveis à “evolução” de determinada característica (diversidade gênica), sem a necessidade de conhecer a estrutura e a função da proteína (MCCULLUM *et al.*, 2010; STIMPLE; SMITH; TESSIER, 2020). Embora a estratégia de evolução dirigida seja poderosa, o processo de evolução direcionada requer uma metodologia de *screening* de alto rendimento. Além disso, nem todas as enzimas são passíveis de desenvolver um método de rastreamento eficaz e fácil de implementar na escala desejável. A Figura 6 mostra o processo simplificado para obter proteínas com propriedades melhoradas por meio de evolução dirigida.

Figura 6 – Esquema simplificado do processo de evolução dirigida *in vitro* de proteínas

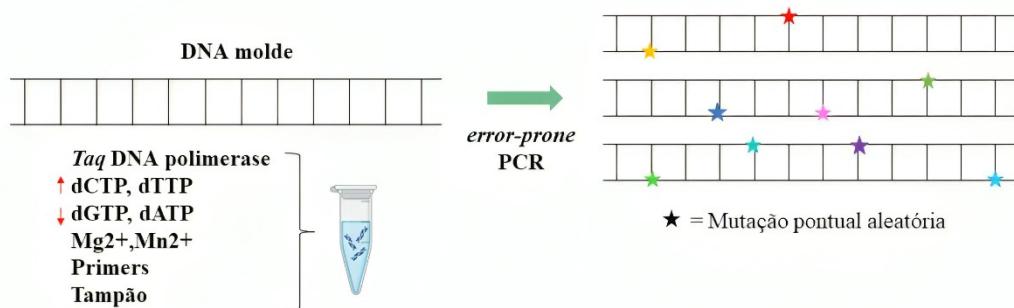


Fonte: adaptado de Bloom *et al.*, (2009). Técnica de evolução dirigida para aprimorar as características de proteínas.

Esta diversidade gênica é tipicamente introduzida por duas técnicas principais: mutagênese aleatória por reação em cadeia da polimerase, também conhecida como *error-prone PCR* ou métodos de recombinação gênica *in vitro* (embaralhamento de DNA). A *epPCR*, é um método simples, eficiente e restrito à região de interesse do gene caracterizado . Primeiramente descrita por Cadwell e Joyce em 1992, essa metodologia propõe uma reação de

mutagênese, alterando de forma proporcional os componentes da reação da PCR. Esta técnica permite uma modulação da razão e frequência de mutações adicionados por uma TaqDNA polimerase de baixa fidelidade (ECKERT; KUNKEL, 1991), a partir de variações nas concentrações do cofator magnésio, na adição de manganês, nas proporções de alteradas de dNTP (A,C,G,T) e no número de ciclos da PCR (CADWELL; JOYCE, 1992). Uma representação simplificada da *epPCR* pode ser observada na Figura 7.

Figura 7 – Inserção de randômicas no DNA através da técnica de *error-prone* PCR



Fonte: adaptado de Mccullum *et al.*, (2010). Modificações nos componentes da PCR permitem a geração de mutações aleatórias nas fitas produzidas, gerando a diversidade gênica.

O objetivo de modificar a reação em cadeia da polimerase tradicional é introduzir mutações pontuais randômicas em genes clonados. Essas mutações podem ser inseridas em regiões estruturalmente e funcionalmente importantes, capazes de gerar alterações maléficas ou benéficas que podem ser selecionadas. Esta estratégia, acoplada a um eficiente método de *screening*, é útil quando não se conhece totalmente posições na sequência de aminoácidos de proteínas que causem alterações significativas. Essas alterações são capazes de gerar taxas de mutação variadas. Entretanto, se muito baixas acabam não gerando tanta diversidade e se muito altas aumentam a chance de gerar muitas mutações deletérias. Portanto, o ideal, de acordo com a maioria dos artigos científicos sobre o tema, é utilizar condições que gerem taxas médias de mutação (~ 1%) para um determinado número de ciclos, geralmente 25 a 30.(CADWELL; JOYCE, 1992; DAVID S. WILSON; ANTHONY D. KEEFE, 2000).

Já o embaralhamento de DNA é uma técnica desenvolvida que introduz recombinação aleatória nos genes durante uma etapa de mistura das sequências (STEMMER, 1994). No embaralhamento de DNA, os genes de interesse (derivados de genes ortólogos ou de mutantes selecionados após *epPCR*) são fragmentados com DNase I. Estes fragmentos são

então purificados e recombinados em uma reação de PCR padrão, entretanto, sem a adição de oligonucleotídeos externos. Posteriormente, os oligonucleotídeos externos são adicionados no último passo de extensão e a sequência completa do gene é extendida, amplificada e subsequentemente clonada em um vetor de expressão. As bibliotecas de novas combinações são posteriormente submetidas à seleção em uma nova etapa de embaralhamento de genes e seleção (MCLURE; RADFORD; BROCKWELL, 2022; WERKMAN; PATTANAIK; YUAN, 2011). O interesse na engenharia de proteínas tem crescido significativamente nos últimos anos e muitos exemplos de enzimas terapêuticas e anticorpos com importantes aplicações na saúde, estão sendo obtidos.

As técnicas de evolução dirigida, embora sejam eficientes para gerar mutações, necessitam de um método eficiente de *screening* ou seleção para diferenciar as mutações desejadas das indesejadas. A biblioteca de genes mutantes gerada precisa ser submetida a um processo de *screening* ou seleção eficaz e os mutantes que mostrarem melhor desempenho para determinada propriedade de interesse são identificados e isolados. É possível afirmar que esta é a etapa mais crítica e o maior gargalo do processo de evolução *in vitro* de proteínas (XIAO; BAO; ZHAO, 2015). O *screening* e a seleção são os dois principais métodos de análise de bibliotecas. O *screening* refere-se à avaliação de cada proteína para a propriedade desejada, enquanto a seleção elimina automaticamente as variantes não funcionais.

O *screening* em placas de microtitulação é bastante utilizado e descrito na literatura. Uma placa de microtitulação miniaturiza os tubos de ensaio para vários poços, sendo a placa de 96 poços o formato mais utilizado. Os ensaios tradicionais realizados numa placa de microtitulação adicionando componentes de reação e extratos celulares brutos ou proteínas purificadas manualmente. No entanto, o rendimento pode ser muito melhorado com a ajuda de sistemas robóticos (WATT *et al.*, 2000). Os ensaios colorimétricos ou fluorométricos são os mais convenientes entre os numerosos ensaios de atividade enzimática em placas de microtitulação (HE *et al.*, 2011; MACK *et al.*, 2008). Para certas reações enzimáticas, o desaparecimento de substratos ou a formação de produtos pode ser facilmente identificado por observação macroscópica ou por medição da absorvância ou fluorescência UV-vis ou fluorescência utilizando um leitor de placas. O *screening* em placas de Petri, em que a atividade catalítica é diretamente monitorizada em placas de ágar, são adequados para o *screening* de bibliotecas de até algumas centenas de milhares de clones (JOO *et al.*, 1999). Este formato de ensaio é particularmente conveniente pois não é necessária qualquer preparação ou purificação das células ou da enzima recombinante. A disponibilidade comercial de uma grande variedade de indicadores de pH cromogénicos permite o desenvolvimento de ensaios em placa de ágar

para a hidrólise catalítica de substratos específicos. As colônias que expressam variantes de enzimas altamente ativas podem ser identificadas pela mudança de cor no meio sólido resultante de uma mudança do pH do ambiente local em torno dos clones ativos (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997; MAHAJAN *et al.*, 2013; MIHOOLIYA *et al.*, 2017).

Além disso, para a seleção de proteínas existem as tecnologias display, onde a proteína traduzida está fisicamente ligada ao gene que a codifica ou o gene é restringido numa partícula de vírus que exibe a proteína. A biblioteca de proteínas apresentada é facilmente acessível no ambiente externo e, por conseguinte, pode ser sujeita a uma seleção de alto rendimento para as propriedades desejadas. Finalmente, os genes ligados às variantes proteicas selecionadas podem ser facilmente rastreados e amplificados. O phage display é a técnica de mais bem descrita para a seleção *in vitro* (DUNN IAN S, 1996; PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010). Nas experiências típicas de exposição de fagos, são utilizados fagos filamentosos (como o M13) pela sua capacidade de infetar hospedeiros bacterianos sem os matar. Uma biblioteca de DNA fagóide é construída *in vitro* e transformada em células bacterianas competentes. A proteína a ser exibida é fundida com uma das proteínas do revestimento (pIII ou pVIII) e é apresentada na superfície do fago quando este é montado na célula hospedeira (SMITH; PETRENKO, 1997). O DNA que codifica a proteína será retido na partícula de fago e recuperado posteriormente. A exposição de fagos baseia-se naturalmente na ligação, o que o torna um sistema eficaz de seleção de proteínas (SIDHU *et al.*, 2000). Graças a estes métodos de *screening* e seleção, grandes bibliotecas construídas por várias estratégias geradoras de diversidade podem ser rastreadas ou selecionadas de forma abrangente e, como resultado, se obter uma variante proteica com as propriedades desejadas.

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é tradicionalmente um grande importador de medicamentos biológicos, e cerca de 51% dos gastos com remédios e drogas feito pelo ministério da saúde nos últimos anos, foi com biofármacos. As Parcerias de Desenvolvimento Produtivo (PDPs) têm surgido como estratégia para fortalecimento da produção no Brasil, por meio da transferência de tecnologia e são uma estratégia para amenizar a falta de fármacos produzidos no País, através do incentivo da produção nacional de medicamentos, cujas patentes expiram. Contudo, em relação aos medicamentos melhorados (Biobetters) derivados dessas patentes, ou aqueles completamente novos, o Brasil tem baixa participação nesse desenvolvimento.

Dentre os biofármacos mais utilizados no Brasil, está a L-asparaginase II, uma proteína comumente utilizada no tratamento da leucemia linfoide aguda (MÜLLER; BOOS, 1998). A principal formulação utilizada nos tratamentos quimioterápicos é a proveniente da bactéria *Escherichia coli*, que apesar de eficiente, pode causar casos frequentes de hipersensibilidade (ROSANO; CECCARELLI, 2014; ULU; ATES, 2017). Apesar da importância do medicamento, segundo a portaria número 840, de 08 de setembro de 2014, que aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas da Leucemia Mieloide Aguda de Crianças e Adolescentes, e considerando a avaliação técnica da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias do SUS (CONITEC), a oferta de L-asparaginase não tem suprido a demanda imposta pelo mercado brasileiro. A gravidade da situação brasileira, considerando a importância do biofármaco no contexto terapêutico e social, somado ao problema de desabastecimento, culminou com a inclusão da L-asparaginase na lista de prioridades do SUS e Ministério da Saúde.

Alguns anos atrás, para resolver essa situação, o governo brasileiro começou a fornecer via SUS uma alternativa mais barata, a Leuginase® um biofármaco de origem chinesa. No entanto, a aparente falta de estudos clínicos e escassez de informações de segurança aliada a casos de baixa eficiência e insatisfação da comunidade médica com o biofármaco geraram debates entre os oncologistas e o governo brasileiro acerca de sua utilização, levando sua retirada do mercado nacional (ZENATTI *et al.*, 2018). Desta forma, torna-se imprescindível que as instituições de saúde dominem as etapas de produção deste biofármaco em território nacional para reduzir custos de importação, já que as doses são bem caras e utilizam-se várias delas no tratamento de um único indivíduo. Além disso, é preciso que se invista na busca por L-asparaginases de novas fontes e com propriedades farmacocinéticas melhoradas.

O Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para Saúde (GEPeSS), da Fiocruz-CE, já possui um amplo histórico de estudos com L-asparaginases. Tanto as L-ASNases microbianas, de *E. coli* e *B. subtilis*, quanto a L-ASNase humana têm sido estudadas com foco na aplicação em tratamentos contra a Leucemia Linfoides Aguda, em projetos já concluídos e em andamento (CAETANO LUDMILLA FREIRE, 2020; GUIMARÃES; FROTA; LOURENZONI, 2021; GUIMARÃES, 2019). Além disso, possui estudo com evolução *in vitro* de fragmentos de anticorpo, utilizando técnicas de engenharia de proteínas (BEZERRA, 2019). Este trabalho é o primeiro do grupo a focar na evolução dirigida de L-ASNases, mais especificamente de *B. subtilis*, para aplicação terapêutica.

3 HIPÓTESES

- A) É possível empregar técnicas de evolução dirigida para produzir enzimas com propriedades melhoradas (atividade, afinidade e estabilidade) e com poucos efeitos adversos.
- B) É viável o desenvolvimento e utilização de um método de *screening* simples e rápido em meio sólido para rastrear e selecionar L-ASNases recombinantes extracelulares com atividade asparaginásica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma L-asparaginase do tipo II de *Bacillus subtilis* com maior eficiência catalítica utilizando técnicas de evolução dirigida.

4.2 Objetivos Específicos

Para alcançar o objetivo geral deste projeto, é estabelecida uma série de etapas essenciais para a produção e caracterização dos mutantes de BsAII. Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- a) Amplificar o gene *ansZ* por *epPCR* e clonar os produtos em vetor de expressão constitutiva.
- b) Analisar a quantidade, a natureza e a frequência das mutações geradas determinar a taxa de mutação mais adequada..
- c) Estabelecer um método de *screening* colorimétrico em meio sólido e em meio líquido capaz de selecionar mutantes de forma simples e rápida
- d) Selecionar mutantes de BsAII com atividade enzimática
- e) Otimizar as condições de expressão e purificação das L-ASNases recombinantes.
- f) Caracterizar a BsAII nativa e os mutantes selecionados quanto a expressão, a atividade e a cinética enzimática.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção do material biológico

No presente trabalho, foi utilizado como objeto de estudo a enzimas L-asparaginases II provenientes *B. subtilis* (BsAII). O estudo partiu das sequências gênicas codificadoras dessas enzimas para clonagem em plasmídeos de expressão recombinante. O gene codificador da BsAII (*ansZ*) foi obtidos a partir de vetores pET28a transformados, pertencentes ao grupo de pesquisa. A sequência do gene, bem como a sequência de aminoácidos traduzida a partir dele pode ser observada no Quadro 2.

Quadro 2 – Gene codificador da BsAII (*ansZ*) e sequência proteica da BsAII

ansZ:

```
ATGAAAAAAACAACGAATGCTCGTACTTTTACCGCACTATTGTTGTTTACCGGATGTTCACA
TTCTCCTGAAACAAAAGAATCCCCGAAAGAAAAAGCTCAGACACAAAAAGTCTTCGGCTTCT
GCCTCTGAAAAAAAAGGATCTGCCAACATTAGAATTTCAGCAGCAGGAGGACAGATAGCTGGTG
CCGATCAATCGAAAACCTCAACAACGTGAATATAAACGAGGTGTCGGCGTTGAATCACTGAT
CGAGGCAGTTCCAGAAATGAAGGACATTGCAAACGTCAGCGCGAGCAGATTGTTAACGTCGGC
AGCACAAATATTGATAATAAAATATTGCTGAAGCTGGCGAAACGCATCAACCACCTGCTCGCTT
CAGATGATGTAGACGGAATCGTCGTGACTCATGGAACAGATACTGGAGGAAACCGCTTATT
TTTGAATCTTACCGTAAAAAGTGATAAACCGGTTGTTATTGTCGGTTGATGAGACCTTCCACAG
CCATCAGCGCTGATGGCCTTCTAACCTGTACAATGCACTGAAAGTGGCAGGTGCCCTGAGGC
AAAAGGGAAAGGGACGCTTGTGTTCTAACGACCGGATTGCCTCAGCCGATATGTCACCAA
ACAAACACAACACTACAACAGATACTTAAATCAGAAGAAATGGGCTCGTCGGAACAATTGCA
ATGATATCTATTAAATAATGAGATTACCGTAAGCATAACGAAGGACACGGATTCTCGGTTCT
AATCTTGATGAGCTGCCAGGTTGACATTATCTATGGATACCAAATGACGGAAGCTACCTGTT
TGACGCTGCTGTTAAAAGCCGGAGCAAAGGGGATTGTATTGCGGTTCTGGAACGGGTCTTTA
TCTGATGCAGCCGAAAAGGGGCGGACAGCGCAGTCAAAAAGGCCTACAGTGGTGCCTCT
ACCCGCACGGAAATGGTGTGTCACACCAACCAAGACTATGCGGAAAAGGACTTGCTGGCAT
CGAACTCTTAAACCCCCAAAAGCACGGATGTTGCTGATGCTGCGCTTACCAAAACAAATGA
TCCTCAAAAATCCAAGCTTATTCAATGAGTATTAA
```

BsAII:

```
MKKQRMLVLFTALLFVFTGCSHSPETKESPKEKAQTQKVSSASASEKKDLPNIRILATGGTIAGADQS
KTSTTEYKAGVVGVESLIEAVPEMKDIANVSQEIQIVNVGSTNIDNKILLKLAKRINHLLASDDVDGIV
VTHGTDLEETAYFLNLTVKSDKPVVIVGSMRSTAISADGPSNLYNAVVKVAGAPEAKGKGTLVVL
NDRIASARYVTKTNTTTDTFKSEEMGFVGTIADDIYFNNEITRKHTKDTDFSVNLDLDELQPVDIYGY
QNDGSYLFDAAVKAGAKGIVFAGSGNGSLDAEKGADSAVKKGVTVVRSTRGNGVVTNPQDYA
EKDLLASNLSNPQKARMLLMALTKTNDPQKIQAYFNEY
```

Fonte: base de dados European Nucleotide Archive.

A sequência sinal original que está presente nos genes não foi utilizada, pois os cassetes de expressão dos vetores utilizados neste trabalho possuem sua própria sequência sinal para exportação, com códon iniciador da tradução. Dessa forma, tais sequências nativas não foram consideradas na montagem de primers para a amplificação dos genes. Os plasmídeos

utilizados foram obtidos do estoque do grupo de pesquisa. O vetor de expressão, chamado de RPC, é uma versão do vetor pT7BsXA, derivado do plasmídeo pT7T3-18U, com modificações na origem de replicação e com a presença de um cassete de expressão constitutiva (LOURENZONI *et al*, 2016) que possui gene de resistência à ampicilina e carbenicilina, antibióticos que foram utilizados para selecionar culturas transformadas com esse vetor.

5.2 PCR mutagênica do gene *ansZ* de *B. subtilis*

Os primers utilizados foram obtidos da ThermoFisher Scientific. O gene *ansZ*, contido em um vetor pET28a, foi utilizado como molde para uma amplificação *epPCR* com adição de sequência-His no correspondente à posição N-terminal da proteína (produto de PCR chamado *ansZ_HisN*). As sequências estão mostradas no Quadro 3. Foram adicionadas aos primers sequências referentes aos sítios de restrição das enzimas *NheI* e *BamHI*, nos primers *forward* e *reverse*, respectivamente

Quadro 3 – Sequências de primers utilizados nas amplificações por *epPCR*

Produto da <i>epPCR</i>	Primers
<i>ansZ_HisN</i>	Forward: 5'- ATAT <u>GCTAGC</u> CATCATCATCATCATCCTGAAACAAAAGAATCC-3' Reverse: 5'-ATCAG <u>GGATCC</u> TTAATACTCATTGAAATAAGC-3'

Fonte: Elaborado pelo autor. Sequências de primers utilizadas para amplificação do gene *ansZ* por *epPCR*, com inserção de caudas de histidina. As sequências sublinhadas nos primers referem-se aos sítios de restrição das enzimas *NheI* (GCTAGC) e *BamHI* (GGATCC), nos primers *forward* e *reverse*, respectivamente.

A *epPCR* foi realizada em três condições diferentes, alterando a concentração de manganês em cada condição. As reações foram preparadas em 50 µL de volume e os valores dos reagentes em cada condição estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1 – Amplificação de *ansZ* por *epPCR*

Reagentes	Condição 1	Condição 2	Condição 3
GoTaq DNA polymerase	5 U	5 U	5 U
Tampão GoTaq 5X	10 µL	10 µL	10 µL
dATP e dGTP	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM

dCTP e dTTP	1 mM	1 mM	1 mM
MgCl₂	7 mM	7 mM	7 mM
MnCl₂	0,25 mM	0,35 mM	0,50 mM
Primers Foward e Reverse	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
DNA molde (pET28-ansZ)	10 ng	10 ng	10 ng
Água	Qsp 50 µL	Qsp 50 µL	Qsp 50 µL

Fonte: Elaborado pelo autor. As concentrações e quantidades dos reagente utilizados nas reações de *epPCR* são iguais para todas as condições, exceto a concentração de manganês, que é crescente da condição 1 para a condição 3.

As reações foram submetidas a termociclagem por 25 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 3 min. Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose para verificação da amplificação, e foram posteriormente purificados com *PCR purification Kit*, *DNA Cleanup®* (Cellco Biotec do Brasil Ltda). Para aumentar o rendimento de material para montagem da reação com T4 ligase, as etapas sugeridas pelo fabricante do kit de purificação foram ligeiramente modificadas, conforme Apêndice A

5.3 Clonagem gênica em sistema pJET

Os produtos da *epPCR* foram utilizados para uma reação de *blunting* (em gelo) aplicando em 10 µL do tampão de reação, 6 µL de água ultrapura, 1 µL da enzima de blunting e 1 µL do produto da *epPCR*. A reação foi então incubada a 70 °C por 5 min e colocada novamente em gelo. Utilizou-se 1 µL do vetor pJET1.2 (50 ng·µL⁻¹), 1 µL da enzima T4 DNA Ligase e 18 µL da reação de *blunting* para realizar uma ligação (20 µL), que foi incubada a temperatura do laboratório (22 °C) por 5 min e depois em armazenada a 4 °C.

5.3.1 Transformação das bactérias *E. coli* quimiocompetentes

Os plasmídeos construídos foram inseridos em células de *E. coli* (Top10) quimiocompetentes por choque térmico, na presença de CaCl₂ 5 mM e MgCl₂ 10 mM, pela sequência de 20 min em gelo, seguido de 45 s a 42 °C e, por fim, mais 2 min em gelo. As células transformadas foram regeneradas durante 1 h em meio SOC (triptona 20 g·L⁻¹, extrato de levedura 5 g·L⁻¹, NaCl 0,584 g·L⁻¹, KCl 0,186 g·L⁻¹, Mg 0,02 M, glicose 0,02 M) estéril, sob agitação de 200 rpm em plataforma agitadora a 37 °C, e posteriormente plaqueadas em placas de ágar Luria Bertani (LB ágar), suplementado com ampicilina 100 mg·L⁻¹. Foi feita PCR de colônia para 10 colônias selecionadas de cada placa, utilizando-se como molde para a PCR

metade da superfície das colônias, e utilizando os primers pJET *Foward* e *Reverse*. Os clones corretos foram confirmados pela verificação do tamanho esperado das sequências amplificadas, em gel de agarose 1% (80V) . A colônias selecionadas de cada placa foram utilizadas como iniciadoras para o cultivo de pré-inóculo, em caldo LB, suplementado com carbenicilina 100 mg·L⁻¹. Os pré-inóculos foram mantidos a 37 °C, durante 16 h, sob agitação de 200 rpm. Parte do pré-inóculo foi utilizada para a extração de DNA plasmidial através do kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega®), conforme Apêndice B, e outra parte estoque em 25% de glicerol, a -80 °C. Os estoques foram nomeados de acordo com os plasmídeos que receberam e com as colônias selecionadas. O DNA plasmidial extraído de todas as amostras foi encaminhado para realização do sequenciamento de Sanger, com a utilização de primers específicos.

5.3.2 Sequenciamento e determinação das taxas de mutação

Para realizar o sequenciamento das amostras de DNA foram preparadas reações de PCR utilizando primers *Foward* e *Reverse* a fim de sequenciar com qualidade toda a extensão do gene *ansZ*. As reações foram preparadas adicionando 3,5 µL de água ultrapura, 1 µL de *BigDye™ Terminator 3.1 Reaction Mix*, 1,5 µL de *BigDye™ Terminator 5X Sequencing Buffer*, 1 µL de primer (*Foward* ou *Reverse* a 3,2 µM) e 3 µL de DNA (60 ng/µL). As reações foram submetidas a termociclagem começando com uma desnaturação a 96 °C por 1 min , seguindo por 30 ciclos 96 °C de 15 s, 50 °C de 15 s e 60 °C por 4 min. Após etapas de precipitação e purificação as amostras foram colocadas no Sequenciador por 24 h. As sequências obtidas no sequenciamento foram analisadas no Software Bioedit®, utilizando a ferramenta ClustalW.

5.4 Construção de uma biblioteca aleatória de mutantes de L-asparaginase

Com base nos resultados do sequenciamento, foram escolhidas duas taxas de mutação referentes às condições de amplificação por *epPCR* Mn 0,25 mM e Mn 0,35 mM para a construção de duas bibliotecas de mutantes. Para a montagem dos plasmídeos a serem utilizados, tanto o produto de amplificação da *epPCR ansZ_HisN* quanto o vetor RPC foram digeridos com as enzimas *NheI* e *BamHI* (Promega®), seguindo as etapas em termociclador de 3 h a 37 °C, e 15 min a 65 °C, de acordo com instruções do fabricante. As reações enzimáticas estão detalhadas no Apêndice C. Após digestão, apenas os vetores foram tratados com fosfatase TSAP (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, Promega®), em termociclador a 37 °C durante

1 h, e a 74 °C durante 15 min. Os vetores digeridos foram então aplicados em gel de agarose 1% (30V) para a separação dos vetores vazios de seus insertos prévios, e os vetores vazios foram excisados do gel para purificação com o *PCR purification Kit, DNA Cleanup®*. Os produtos de *epPCR* e o vetor RPC purificados foram quantificados no equipamento *NanoDrop One - Microvolume UV-Vis Spectrophotometer*, seguindo orientações do fabricante. Foi então preparada uma reação de ligação conforme Apêndice C. A reação foi incubada a 4 °C por 16 h, seguida de uma inativação a 70 °C por 10 min.

5.4.1 Construção da biblioteca nº 1 de mutantes

Para a primeira biblioteca, o plasmídeo construído (*RPC_ansZ_HisN* – Condição 2 (Mn0,35)) foi transformado em bactérias *E. coli* (DH5α) eletrocompetentes, utilizando eletroporador LONZA® nas condições 2,5 kV, 200 Ω, 25 mF. Foram feitas 10 transformações de 1 µL DNA (Ligação) e cada uma foi regenerada em 1 mL de meio SOC por 1 h a 37 °C, sob agitação de 200 rpm. As células transformadas foram plaqueadas por meio de espalhamento com alça de Drigalski em placa de Petri 15x15 cm com LB ágar estéril suplementado com glicose 2g·L⁻¹, asparagina 20g·L⁻¹, azul de bromotimol 0,007%, e carbenicilina 100 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 40 h em estufa bacteriológica. Foi feita uma diluição seriada da ligação transformada para estimar o tamanho da biblioteca construída. As colônias de coloração mais escura da biblioteca foram então selecionadas para uma expressão em placa *deep well* com cultivo de 1 mL.

5.4.2 Construção da biblioteca nº 2 de mutantes

Já para a segunda biblioteca, o plasmídeo construído (*RPC_ansZ_HisN* – Condição 1 (Mn 0,25mM)) foi transformado em bactérias *E. coli* (DH5α) eletrocompetentes, utilizando eletroporador LONZA® nas condições 2,5 kV, 200 Ω, 25 mF. Foi feita 1 transformação de 1 µL de DNA (Ligação) que foi regenerada em 1 mL de meio SOC por 1 h a 37 °C, sob agitação de 200 rpm. As células transformadas foram espalhadas utilizando alça de Drigalski em placa de Petri com LB ágar estéril, suplementada com carbenicilina 100 µg/mL, e a placa foi incubada a 37 °C, por 16 h. Da placa crescida foram selecionadas colônias aleatórias suficientes para iniciar pré inóculos em 4 placas *deep well* em cultivo de 1 mL por poço. Ao término da expressão utilizou-se um carimbo de inoculação de 96 hastas para transferir células das placas *deep well* para uma placa de Petri 15x15 cm com LB ágar estéril suplementado com carbenicilina 100 µg/mL e asparagina 20g·L⁻¹. A placa foi então incubada por 30 °C, sob

agitação de 200 rpm, durante 16 h. O reagente de Nessler foi utilizado para selecionar mutantes diretamente na placa, que foram criopreservados em glicerol 25%, em freezer -80 °C. O DNA plasmidial extraído de todas as amostras foi encaminhado para realização do sequenciamento de Sanger, com a utilização dos primers M13, padrão para os vetores derivados de pT7T3-18U.

5.5 Expressão das proteínas recombinantes em placa *deep well*

Para realizar um *screening* dos mutantes foram selecionadas colônias da biblioteca ou raspagens de estoque de bactérias. Cada colônia ou raspagem de células foi inoculada em 1 mL de caldo de expressão complexo (triptona 35 g·L⁻¹, extrato de levedura 20 g·L⁻¹ e cloreto de Sódio 10 g·L⁻¹) suplementado com carbenicilina 100 µg/mL, utilizando poços diferentes das placas *deep well*. Além disso, inoculou-se também colônias de bactérias que expressam *aspZ* nativa e bactérias que expressam endoglucanase. As placas *deep well* foram incubadas em shaker New Brunswick™ Innova® 44/44R, a 37 °C e 200 rpm, por 16-48 h. Após o término da expressão, as culturas foram centrifugadas a 8000 x g e 4 °C, por 10 min, e os sobrenadantes foram utilizados para quantificação atividade enzimática utilizando o método da indoxina.

5.6 PCR de alta fidelidade do gene da BsAII (*ansZ*)

O gene *ansZ*, contido em vetor RPC, foi utilizado como molde para uma amplificação por PCR de alta fidelidade (*Phusion™ High Fidelity DNA polymerase*). As sequências dos primers utilizados estão mostradas no Quadro 4. Foram adicionadas aos primers sequências referentes aos sítios de restrição das enzimas *NheI* e *BamHI*, nos primers *forward* e *reverse*, respectivamente

Quadro 4 – Sequências de primers utilizados nas amplificações por PCR de alta fidelidade

Produto da PCR	Primers
<i>ansZ</i>	Forward: 5'- ATATG <u>GCTAGCC</u> CTGAAACAAAAGAATCC-3' Reverse: 5'-ATCAG <u>GGATC</u> CTTAATA <u>ACTCATTGAA</u> ATAAGC-3'

Fonte: Elaborado pelo autor. Sequências de primers utilizadas para amplificação do gene *ansZ* por PCR. As sequências sublinhadas nos primers referem-se aos sítios de restrição das enzimas *NheI* (GCTAGC) e *BamHI* (GGATCC), nos primers *forward* e *reverse*, respectivamente.

As reações foram preparadas em 50 µL de volume e os valores dos reagentes em cada condição estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2 – Amplificação de *ansZ* por PCR de alta fidelidade

Reagentes	Quantidades
Phusion DNA polymerase	1U
Tampão Phusion 5X	10 µL
dNTP Mix	200 µM de cada
DMSO	1,5 µL
Primers Forward e Reverse	0,5 µM
DNA molde (RPC-<i>ansZ</i>)	10 ng
Água	Qsp 50 µL

Fonte: Elaborado pelo autor. As concentrações e quantidades dos reagente utilizados nas reações de PCR.

As reações foram submetidas a termociclagem com desnaturação inicial de 98 °C por 30 s seguido de 30 ciclos de 98 °C por 10 s, 50 °C por 30 s e 72 °C por 40 s e extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose para verificação da amplificação, e foram posteriormente purificados com *PCR purification Kit, DNA Cleanup®* (Cellco Biotec do Brasil Ltda).

5.7 Clonagem gênica no vetor pET28a

Para a montagem dos plasmídeos, os mutantes selecionados e o vetor pET28a foram digeridos com as enzimas *NheI* e *BamHI* (Promega®), seguindo as etapas em termociclador de 3 h a 37 °C e 15 min a 65 °C, de acordo com instruções do fabricante. Após digestão, apenas os vetores foram tratados com fosfatase TSAP (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, Promega®), em termociclador a 37 °C durante 1 h e a 74 °C durante 15 min. Os vetores digeridos foram então aplicados em gel de agarose 1% (30V) para a separação dos vetores vazios de seus insertos prévios, e os vetores vazios foram excisados do gel para purificação com o *PCR purification Kit, DNA Cleanup®*.

Os mutantes selecionados e o vetor pET28a purificados foram quantificados por Nanodrop, seguindo orientações do fabricante. Foi então preparada uma reação de ligação conforme Apêndice C. A reação foi incubada a 4 °C, por 16 h, seguida de uma inativação a 70

°C por 10 min.

5.7.1 Transformação das bactérias *E.coli* eletrocompetentes

O plasmídeo construído (pET28a_ *ansZ*_HisN) foi transformado em bactérias *E. coli* (DH5 α) eletrocompetentes, utilizando eletroporador LONZA® nas condições 2,5 kV, 200 Ω , 25 mF. Foi feita uma transformação de 1,5 μ L que foi regenerada em 1 mL de meio SOC por 1 h a 37 °C, sob agitação de 200 rpm. As bactérias regeneradas foram plaqueadas utilizando espalhamento com beads, em placa de Petri com LB ágar estéril suplementado com carbenicilina 100 μ g·mL $^{-1}$ e incubadas a 37 °C por 24 h em estufa bacteriológica. A clonagem foi confirmada por uma PCR de colônias utilizando os primers T7. Os clones corretos foram confirmados pela verificação do tamanho esperado das sequências amplificadas, em gel de agarose 1% (80V). As colônias selecionadas de cada placa foram utilizadas como iniciadoras para o cultivo de pré-inóculo, em caldo LB suplementado com carbenicilina 100 mg·L $^{-1}$. Os pré-inóculos foram mantidos a 37 °C durante 16 h, sob agitação de 200 rpm. Parte do pré-inóculo foi utilizada para a extração de DNA plasmidial através do kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega®), e outra parte foi utilizada para estoque em 25% de glicerol, a -80 °C. Os estoques foram nomeados de acordo com os plasmídeos que receberam e com as colônias selecionadas. O DNA plasmidial extraído de todas as amostras foi encaminhado para realização do sequenciamento de Sanger, com a utilização dos primers T7.

5.8 Expressão das proteínas recombinantes em frascos

O DNA plasmidial dos mutantes selecionados foram transformados em cepas de *E. coli* (BL21) por choque térmico, que foram inoculadas em placas de LB ágar, suplementado com kanamicina 25 mg·L $^{-1}$, e incubadas a 37 °C, durante 16 h. Uma colônia de cada placa e raspagens do estoque de *aspZ* nativa clonada pET28a foram utilizadas como culturas iniciadoras de pré-inóculos, em 5 ml de caldo de expressão complexo, suplementado com kanamicina 25 mg·L $^{-1}$, que foi incubado em tubos agitados em shaker a 200 rpm, a 37 °C, durante 16 h. De cada pré-inóculo foram retirados 1 mL para inocular 100 mL de caldo de expressão complexo suplementado com carbenicilina 100 mg·L $^{-1}$ em erlenmeyers de 500 mL, que foram então incubados em shaker, a 230 rpm e 37 °C. A densidade óptica a 600 nm (DO600) foi acompanhada em espectrofotômetro, com utilização do caldo de expressão complexo não inoculado para realizar o branco do equipamento. Ao atingir a DO na faixa 0,6-

0,8 foi adicionado ao caldo de expressão 30 µL de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1M (concentração final de 0,3 mM no meio de cultura) para induzir a expressão. Os frascos foram incubados no shaker a 17 °C, sob agitação de 230 rpm, durante 16h. Após o término da expressão as culturas foram centrifugadas a 8000 x g e 4 °C, durante 10 min, para obtenção do caldo fermentado livre de células e o pellet de células que foi armazenado a -20 °C.

5.9 Purificação da L-asparaginase recombinante nativa e dos mutantes

Os pellets de células bacterianas foram ressuspensos em tampão de Lise (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, PMSF 1 mM e Triton X-100 1% v/v), a pH 8,0 e transferidos para um becker estéril. As células foram submetidas a sonicação em processador ultrassônico, por 10 min (amplitude 10%, ON 20s OFF 40s) em gelo. Após a sonicação o conteúdo do becker foi centrifugado a 10000 x g, a 4 °C, durante 30 min, parar remover os restos celulares. O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e filtrado com filtros de 0,45 µm (*Merck® Millipore*). As proteínas recombinantes foram purificadas do sobrenadante por cromatografia líquida de afinidade (AKTA pureTM) com coluna de Níquel de 2mL (HisLinkTM), sob fluxo de 1 mL/min, utilizando 20mM e 50mM de imidazol nos tampões de lavagem e 500mM de imidazol na eluição (frações de 2mL). O imidazol foi retirado posteriormente por 5 lavagens consecutivas em filtros para centrífuga (Amicon® Ultra 10 kDa, Merck Milipore) utilizando tampão Tris 50mM NaCl 300mM, pH 8,0. As centrifugações ocorreram a 3000 x g, a 4 °C, durante 20 min.

5.10 Quantificação da atividade enzimática

A atividade asparaginásica das enzimas foram avaliadas através do ensaio de Nessler, como estabelecido por Shifrin *et al.* (1974), com modificações e por meio do método da indoxina, como estabelecido por Lanvers *et al.* (2002), com modificações. No método de Nessler, para preparar a reação enzimática foram adicionados 700 µL de solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, 250 µL de solução de L-Asn 100 mM e 50 µL de enzima. Para o branco da reação, 50 µL de amostra foram substituídos por tampão. As misturas foram incubadas a 37 °C, durante 30 min, e a reação foi interrompida com 100 µL de Ácido Tricloroacético (TCA) 1,5 M. Para a etapa colorimétrica, foram utilizados 75 µL da mistura reacional da foram diluídos em 1050 µL de água ultrapura, e então adicionados 75 µL de

Reagente de Nessler (*Supelco®*), com inversão para misturar e formar cor. Desta mistura, 200 µL foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, lida na absorbância a 436 nm em leitora de placas *EnVision® 2105*. Após subtração do valor do branco, as absorbâncias obtidas foram aplicadas em uma curva padrão de amônia (Apêndice D) para quantificação da amônia liberada. Foi determinado como uma unidade (U) de atividade a quantidade de L-ASNase necessária para produzir 1 µmol de amônia (NH₃) por minuto. O valor da quantidade de amônia produzida foi então aplicado na equação de atividade (1) para quantificação da atividade presente na amostra e a atividade específica foi determinada pela razão entre a atividade e a quantidade de enzima utilizada na reação, como mostra a equação (2) :

$$\text{Atividade (U)} = \frac{\text{Quantidade de amônia produzida (umol)}}{\text{tempo da reação (min)}} \quad (1)$$

$$\text{Atividade específica (U/mg)} = \frac{\text{Atividade da enzima (U)}}{\text{Quantidade de enzima na reação (mg)}} \quad (2)$$

De forma similar, no método da indoxina, a reação enzimática foi preparada adicionando 90 µL de solução de tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM, pH 8,0, 10 uL de uma solução de AHA 20 mM e 100 µL de enzima. Para o branco da reação, 50 µL de amostra foram substituídos por tampão. As misturas foram incubadas a 37 °C, durante 30 min, e a reação foi interrompida com 100 µL de Ácido Tricloroacético (TCA) 1,5 M. Para a etapa colorimétrica, 50 µL da mistura reacional foram adicionados a 200 µL de solução de oxina ((1 volume de solução de 8-hidroxiquinolina 2% em etanol absoluto (p/v) e 3 volumes de uma solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 1 M)). Desta mistura, 200 µL foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e lido na absorbância de 710 nm em leitora de placas *EnVision® 2105*.

5.11 Cinética enzimática da L-asparaginase recombinante nativa e dos mutantes

A avaliação cinética da enzima nativa e dos mutantes foi avaliada através de ensaios de atividade pelo método de Nessler, com variação da concentração do substrato Asn. Foi utilizada concentração proteica de 1µM, equivalente a 0,04 mg/ml de enzima. As concentrações de substrato utilizadas foram de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 mM. Os resultados de quantidade de amônia produzida foram tratados na forma de Velocidade inicial (V₀), realizando-se a razão entre a quantidade de amônia e o tempo do ensaio de atividade (30

min), dando um resultado em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$. Os dados foram então analisados no software OriginPro® 8.5 para construção de gráficos de V_0 em função da concentração de Asn, utilizando-se a equação 3, de Michaelis-Menten, para a construção da curva:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad (3)$$

Onde a velocidade inicial (V_0) é dada em função da concentração de substrato (S) e das constantes cinéticas velocidade máxima da reação (V_{\max}) e constante de Michaelis-Menten (K_m). Com base na curva construída, K_m e V_{\max} foram fornecidos pelo software.

5.12 Análises eletroforéticas

As análises de DNA realizadas nos procedimentos de *epPCR*, PCR de colônias e digestão foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, sob voltagem fixa de 80 V para as PCRs e voltagem fixa de 30 V para a digestão. Foi adicionado às amostras e ao marcador de peso molecular o *DNA Loading Buffer 6x (TransGen Biotech Co.®)* contendo *GelRed®*, para a marcação fluorescente das bandas de DNA. Os marcadores de peso molecular utilizados foram: 1 Kb DNA Ladder (LGC Biotecnologia®) e Sigma 1 Kb ladder. Os resultados das eletroforeses de DNA foram analisados e as imagens capturadas no fotodocumentador *Invitrogen™ iBright FL1000 Imager*.

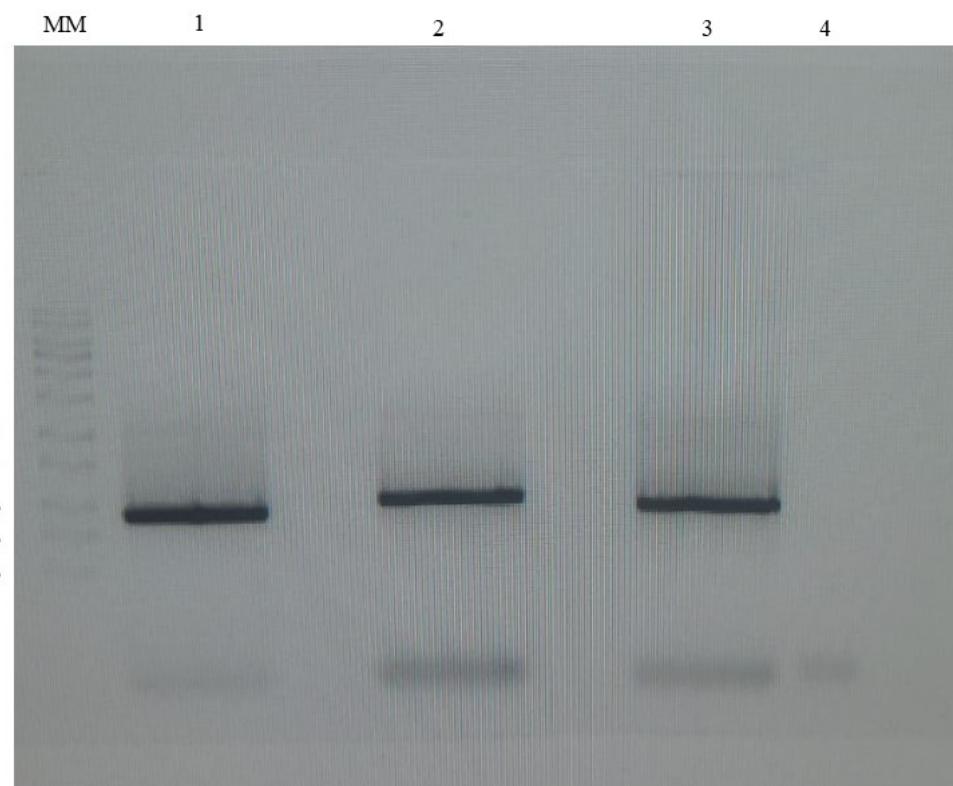
As análises dos perfis de proteínas nas diferentes amostras foram realizadas através de eletroforeses em géis de poliacrilamida com dodecil sulfato (SDS-PAGE) com gel de empilhamento e separação a 5% e 12%, respectivamente, com coloração azul de Comassie (LAEMMLI, 1970). Os marcadores de peso molecular utilizado nas análises foram: *TrueColor High Range Protein Marker S2600* (9-245 kDa, Sinapse Biotecnologia) e *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (10-260 kDa. Thermo Scientific). As amostras foram preparadas adicionando 20 μL de proteína em 5 μL de tampão de amostra 5x (com β -mercaptoetanol 1% v/v), com incubação a 100 °C, durante 10 min. Foram aplicados 10 μL das amostras preparadas. As corridas foram realizadas em cuba vertical, com voltagem fixa de 120V.

6 RESULTADOS

6.1 Amplificação do gene da BsAII por *epPCR*

Para a amplificação do gene *ansZ* por *epPCR* foi utilizado como molde o vetor pET28a, o que evita que o plasmídeo vazio seja transformado junto com o DNA da biblioteca gênica construída, uma vez que o vetor RPC e o vetor pET28a possuem resistência a antibióticos diferentes, garantindo que apenas o vetor RPC_ *ansZ*_HisN seja transformado. A amplificação do gene *ansZ* foi bem sucedida, como é mostrado pela presença das bandas no gel de agarose com marcação fluorescente na Figura 8, bem como pela ausência de bandas no controle negativo, onde não houve adição de DNA. As condições 1, 2 e 3 de *epPCR* utilizaram 0,25 mM de MnCl₂, 0,35 mM de MnCl₂ e 0,50 mM de MnCl₂, respectivamente.

Figura 8 – Gel de agarose evidenciando a amplificação dos genes da BsAII por *error-prone PCR*



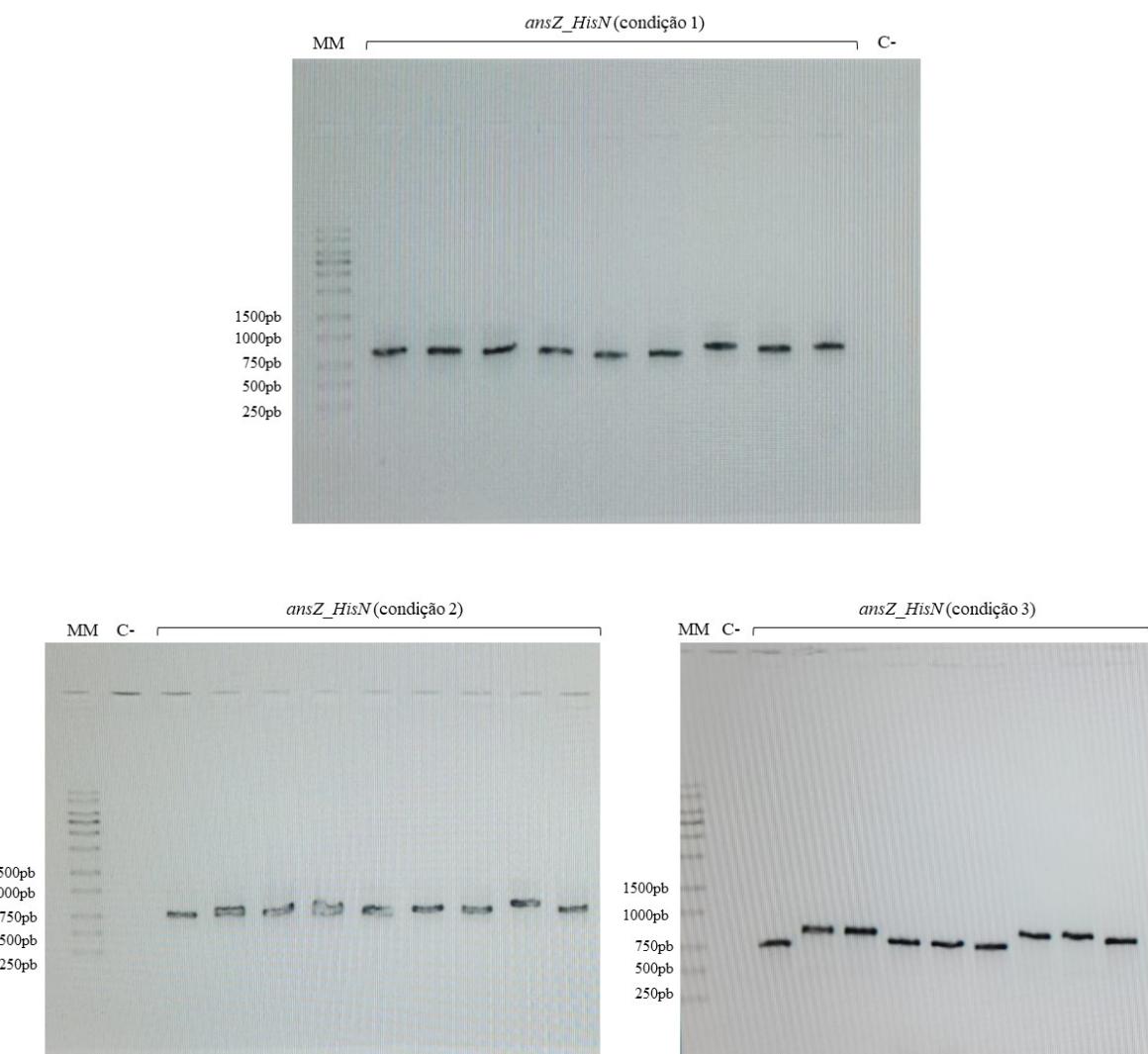
Fonte: Elaborado pelo autor. Gel de agarose 1% mostrando a presença dos genes amplificados pelas reações de *epPCR*, capturados no equipamento *iBright FL1000*. MM: marcador de peso molecular (1kb DNA ladder ((LGC Biotecnologia®)), 1: *ansZ*_HisN (Mn = 0,25mM), 2: *ansZ*_HisN (Mn = 0,35mM), 3: *ansZ*_HisN (Mn = 0,50mM), 4: controle negativo da amplificação.

A presença das bandas no gel da altura esperada, de aproximadamente 1000 pares de base, considerando também os primers utilizados, confirma que os genes amplificados são de fato os genes de interesse, mas não permite a identificação do sucesso de inserção da cauda de histidina nas sequências, por ser de tamanho pequeno para provocar alguma mudança significativa na posição das bandas no gel. Devido a isso, ao final da clonagem, o sequenciamento dos genes foi necessário para averiguar esta questão, bem como atestar a presença de possíveis mutações decorrentes de erros da reação. A amplificação permitiu também que fossem adicionados às sequências os sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas *NheI* e *BamHI*, as mesmas que reconhecem sítios nos vetores RPC, sendo o sítio para clivagem da *NheI* presente ao final da sequência sinal do cassete de expressão, garantindo que o gene seja traduzido logo após a produção do peptídeo sinal (LOURENZONI *et al*, 2016). Dessa forma, tanto insertos quanto vetores puderam ser digeridos com as mesmas enzimas, produzindo extremidades coesivas para garantir a orientação correta durante a realização da reação de ligação.

6.2 Clonagem gênica da *epPCR* no vetor pJET

A clonagem gênica em pJET foi bem sucedida, com o objetivo de sequenciar os produtos da *epPCR*. As diferentes amostras de células de *E. coli* DH5 α transformadas por choque térmico com as três construções de plasmídeos apresentaram todas bom crescimento em placa de LB-ágar suplementada com carbenicilina, esse crescimento garante que as células foram transformadas com os plasmídeos que possuem o gene de resistência, mas não atesta a presença dos genes de interesse nesses vetores, motivo pelo qual foi realizada a PCR de colônia, selecionando-se clones isolados aleatórios para a amplificação do gene de interesse. Como é mostrado na Figura 9, as três construções apresentaram colônias positivas para a presença do gene da L-asparaginase.

Figura 9 – Géis de agarose mostrando a PCR de colônias de *E. coli* transformadas com construções pJET-*ansZ*



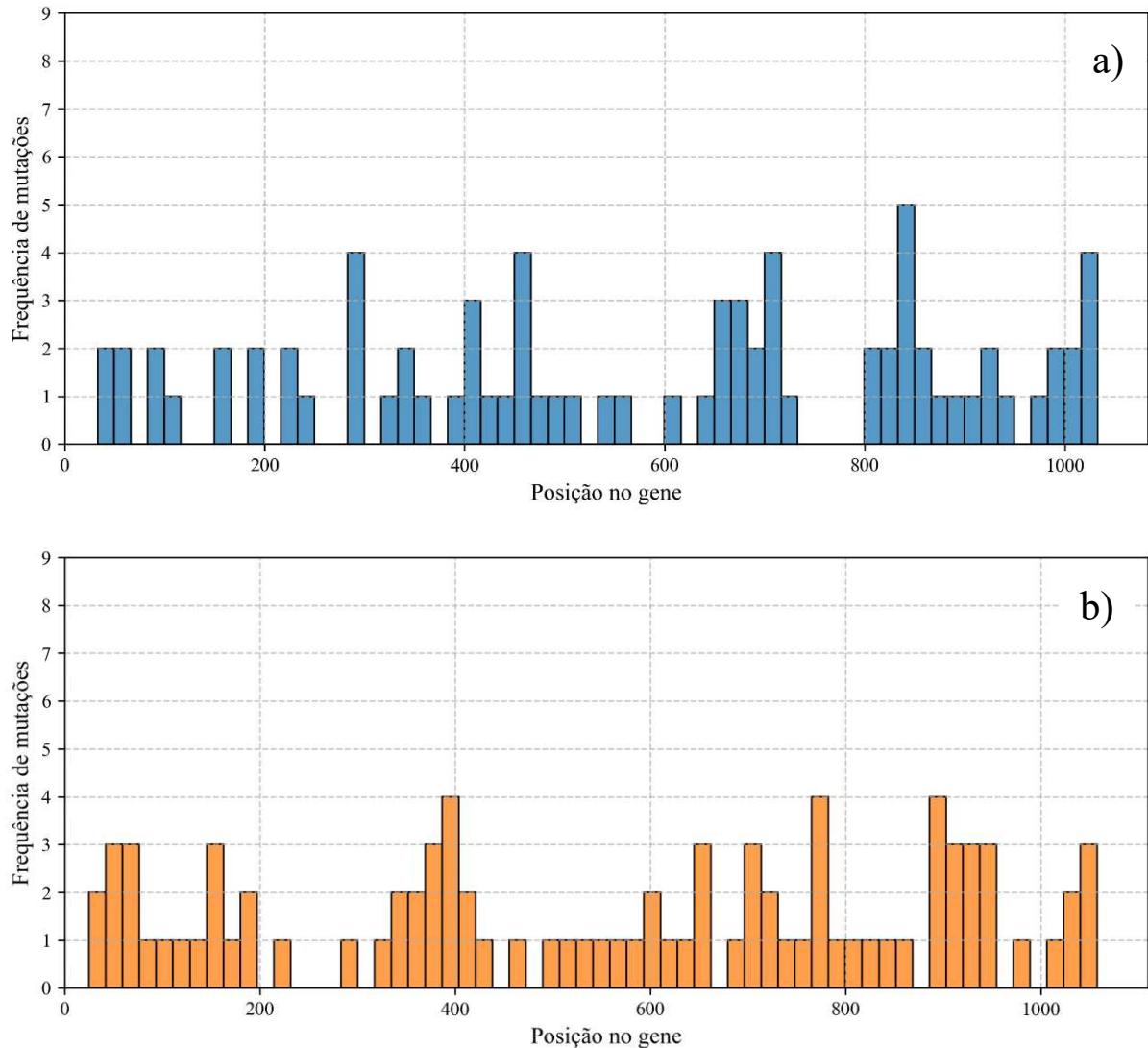
Fonte: Elaborado pelo autor. Géis de agarose 1% mostrando a presença dos genes amplificados pela PCR de colônia. O material genético foi proveniente das bactérias transformadas com as construções pJET-*ansZ* para as três condições de *epPCR*, capturados no equipamento iBright FL1000. A indicação dos genes está mostrado acima das raias. MM: marcador de peso molecular (1kb DNA ladder ((LGC Biotecnologia®))), C- : controles negativos das amplificações.

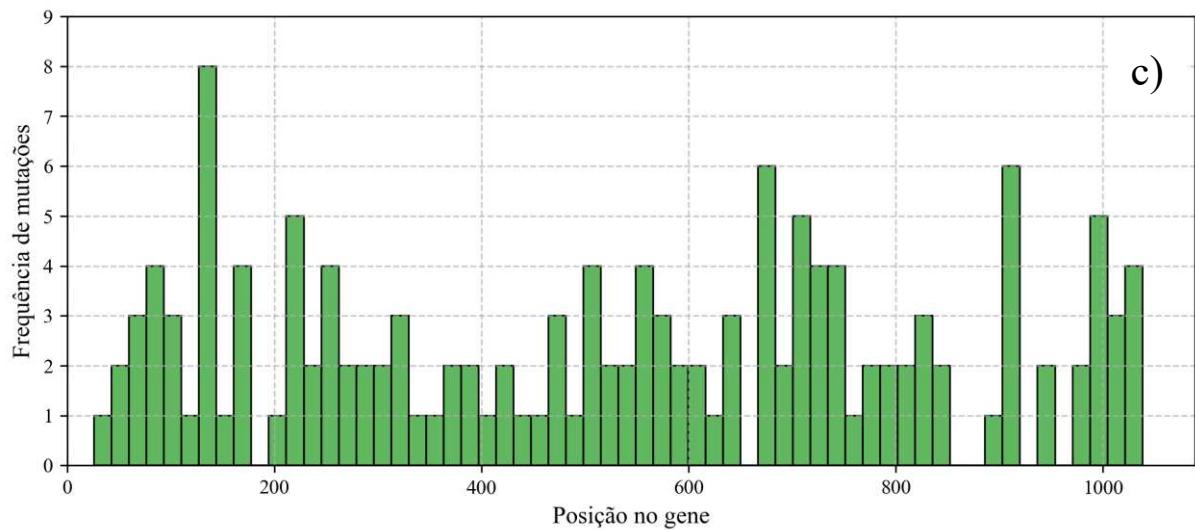
Foram escolhidas oito colônias positivas de cada placa e inoculadas em meio líquido para a produção de estoque bacteriano, a -80 °C. A extração dos plasmídeos das bactérias permitiu a realização do sequenciamento das amostras, para a verificação da natureza, da quantidade e da distribuição das mutações geradas no gene em cada condição de *epPCR*.

6.3 Sequenciamento e análise das mutações

O sequenciamento com utilização de primers pJET forward e reverse permitiu a cobertura de toda a extensão dos genes codificadores da L-ASNase II de *B. subtilis* (*ansZ*) com boa qualidade para todas as três condições. Nas posições onde houve incerteza da base nitrogenada presente, a análise dos eletroferogramas permitiu distinguir a base detectada pelo equipamento. O sequenciamento foi utilizado para determinar a taxa e o perfil de mutações geradas por cada condição de *epPCR*. Como estes mutantes foram aleatoriamente selecionados, as sequências não necessariamente traduzem proteínas funcionais, mas servem como base para verificar como a quantidade de mutações varia com concentração de manganês e na reação de *epPCR*. Conforme pode-se observar na Figura 10, as mutações foram inseridas ao longo de toda a sequência do gene *ansZ* de maneira uniforme.

Figura 10 – Distribuição das mutações no gene *ansZ* em cada condição de *epPCR*

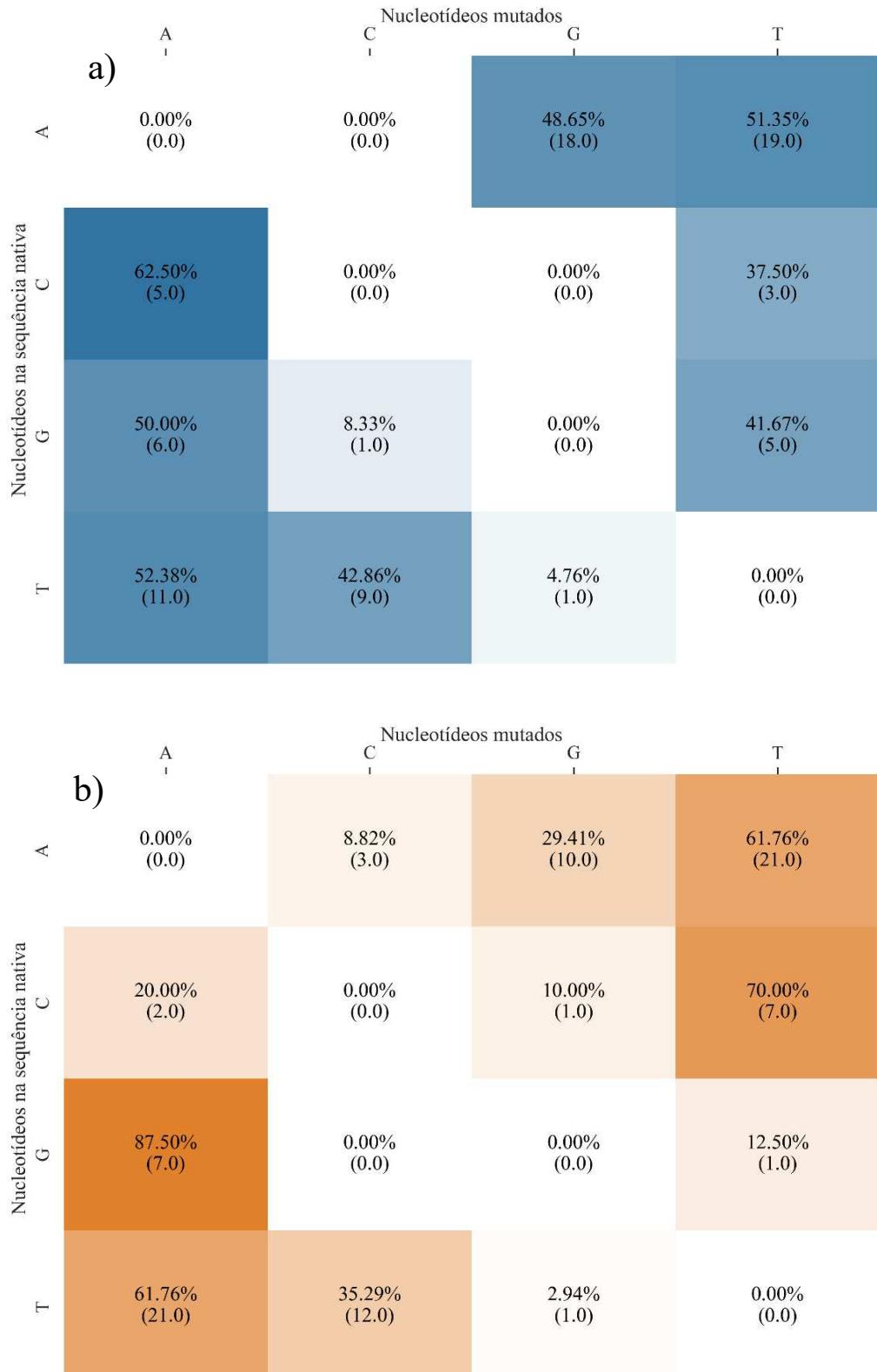


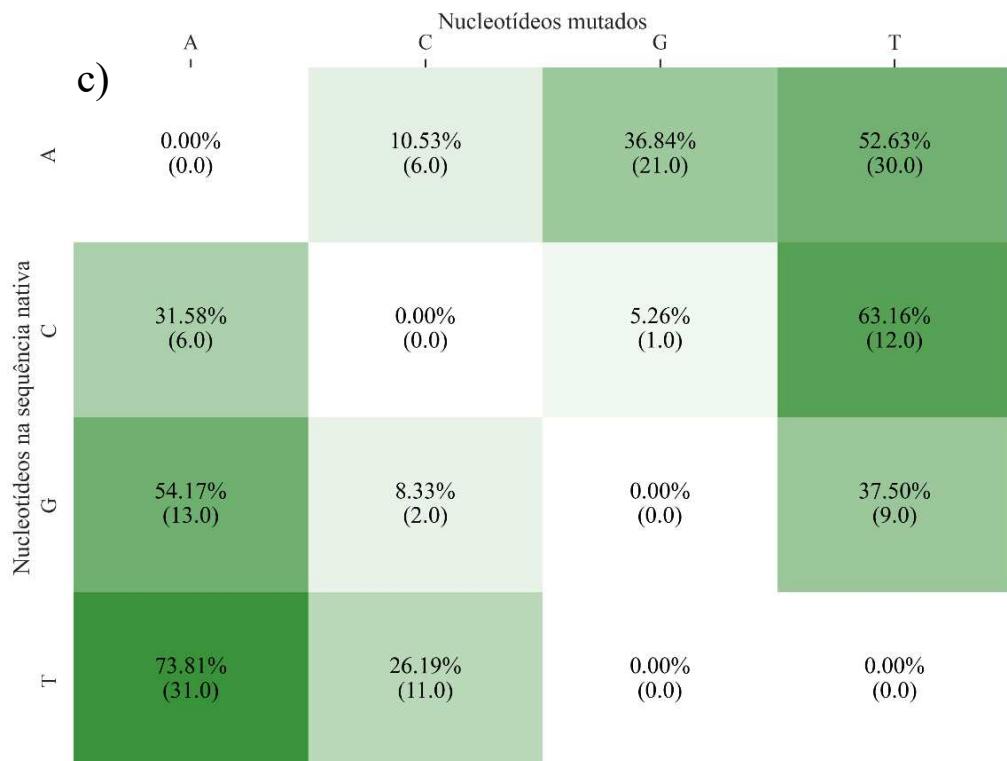


Fonte: Elaborado pelo autor. As barras em azul (a), laranja (b) e verde (c) mostram as mutações ao longo do gene *ansZ* geradas pelas condições 1, 2 e 3 da *epPCR*, respectivamente.

Com base na Figura 10, pode-se observar que as mutações foram distribuídas de forma aleatória e uniforme ao longo de toda a extensão do gene da BsAII, comportamento desejado pois aumenta a diversidade de regiões onde as mutações podem surgir, inclusive em aminoácidos que compõem o sítio ativo (Thr61, Tyr75, Ser108, Thr141, Asp142, Lys 214) ou em outro aminoácidos importantes para a interação com o substrato (Gly60, Gly107, Thr109, Gly140, Ser166). Além disso, nota-se um aumento no número de mutações de acordo com o aumento da concentração de manganês. A Figura 11 mostra a quantidade e o tipo das mutações dividido para cada nucleotídeo.

Figura 11 – Heatmaps das mutações no gene *ansZ* para cada condição de *epPCR*

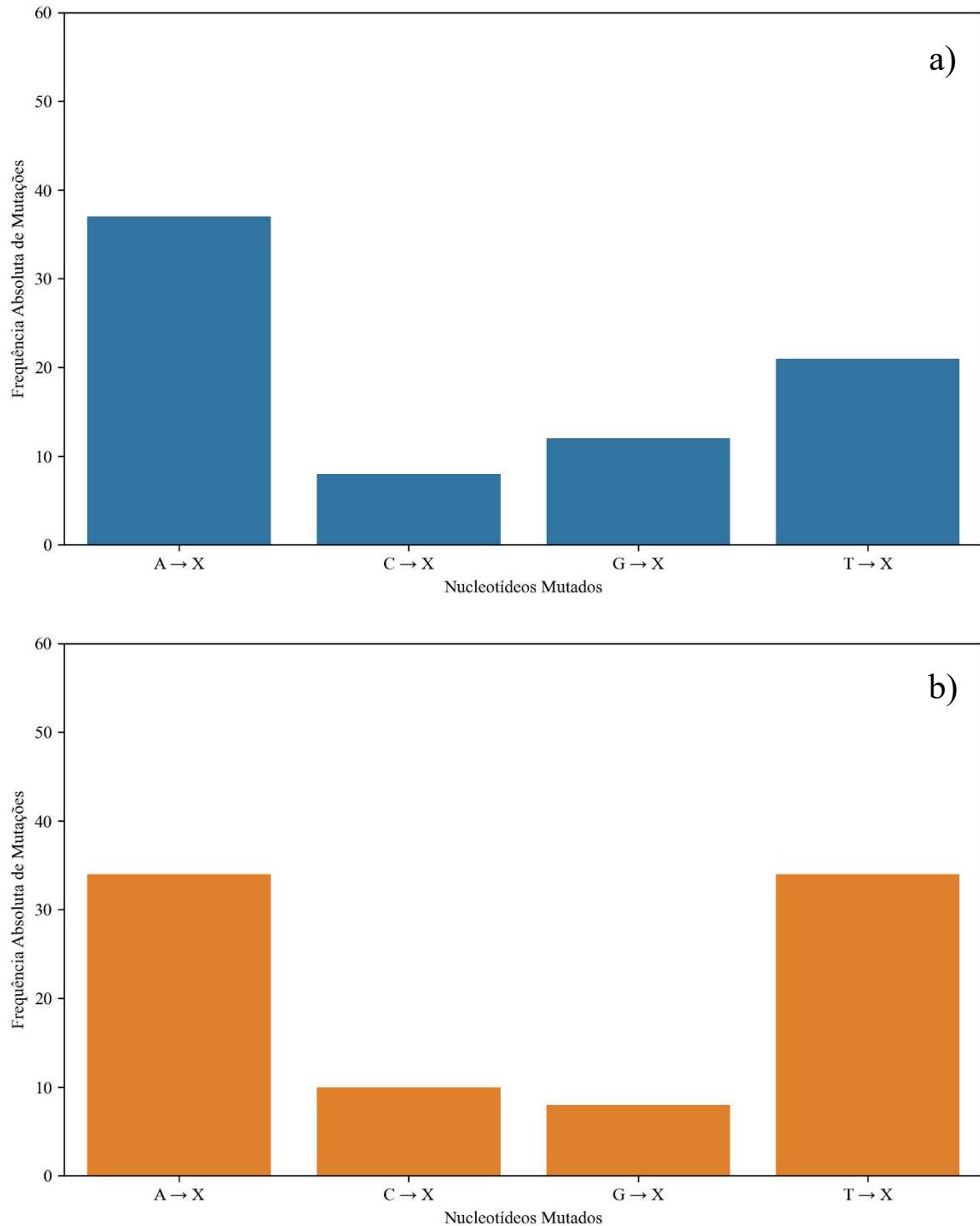


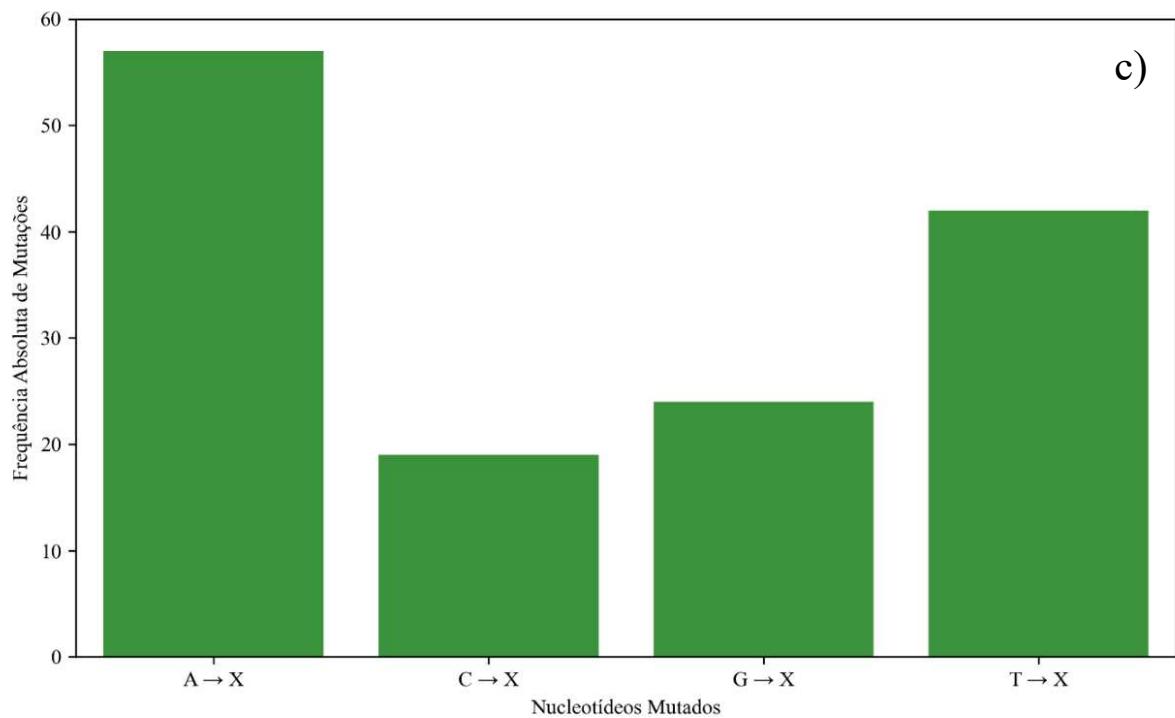


Fonte: Elaborado pelo autor. Em azul (a), laranja (b) e verde (c) estão mostradas a quantidade e o tipo de mutação gerada nas condições 1, 2 e 3 de *epPCR*, respectivamente.

Observando a Figura 11 pode-se constatar que o número de transições (substituição de uma purina – A e G – por outra purina, ou de uma pirimidina – T e C – por outra pirimidina) foi de 36, nas condições 1 e 2, enquanto na 3 foi de 56. Já o número de transversões (substituição de uma purina – A e G – por uma pirimidina –T e C – ou vice-versa) foi de 42, 50 e 100 para as condições 1, 2 e 3 , respectivamente. Conforme mostrado na Figura 12, os nucleotídeos mais mutados foram adenina e timina e os menos mutados, guanina e citosina.

Figura 12 – Frequência de substituições no gene *ansZ* em cada condição de *epPCR*

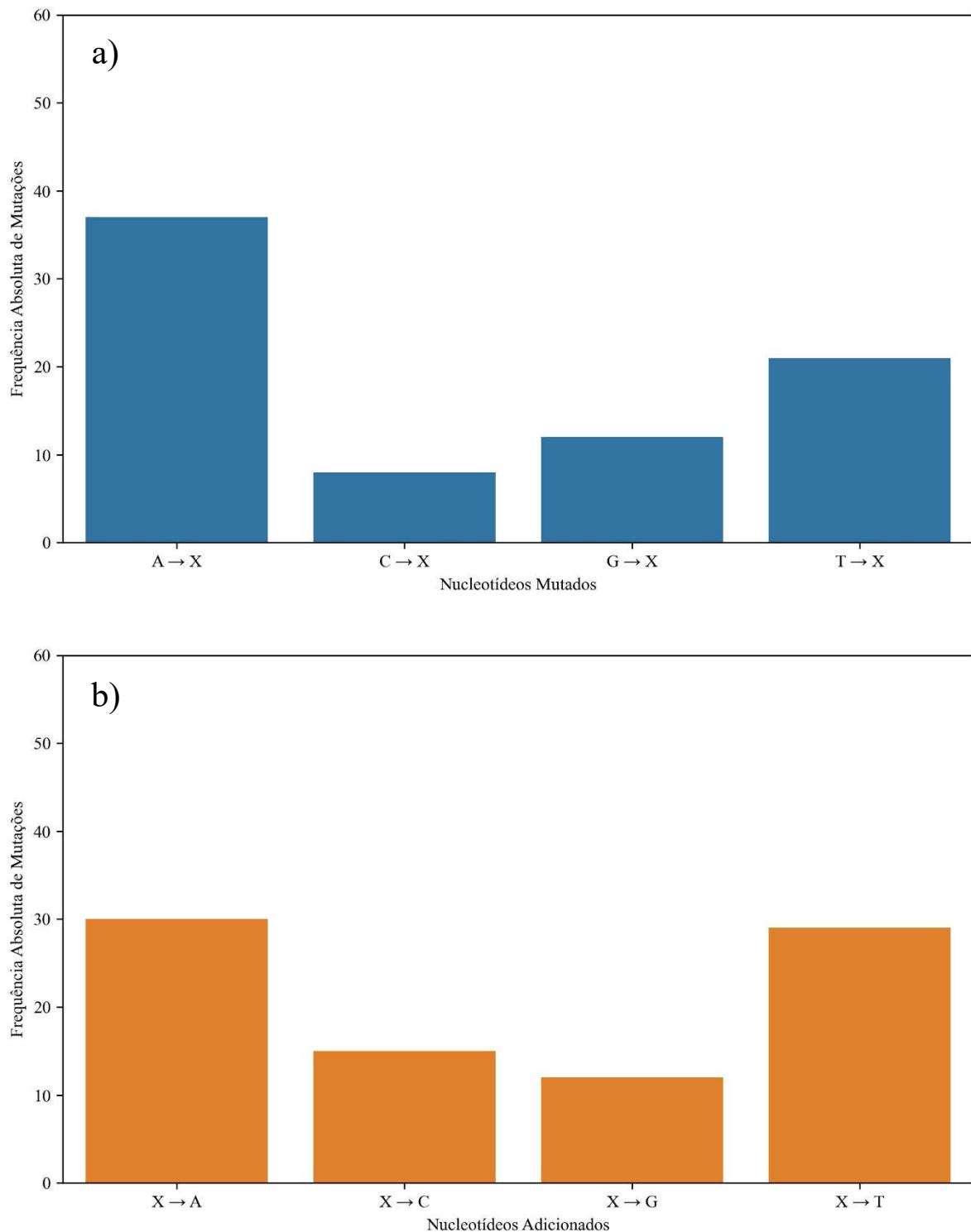


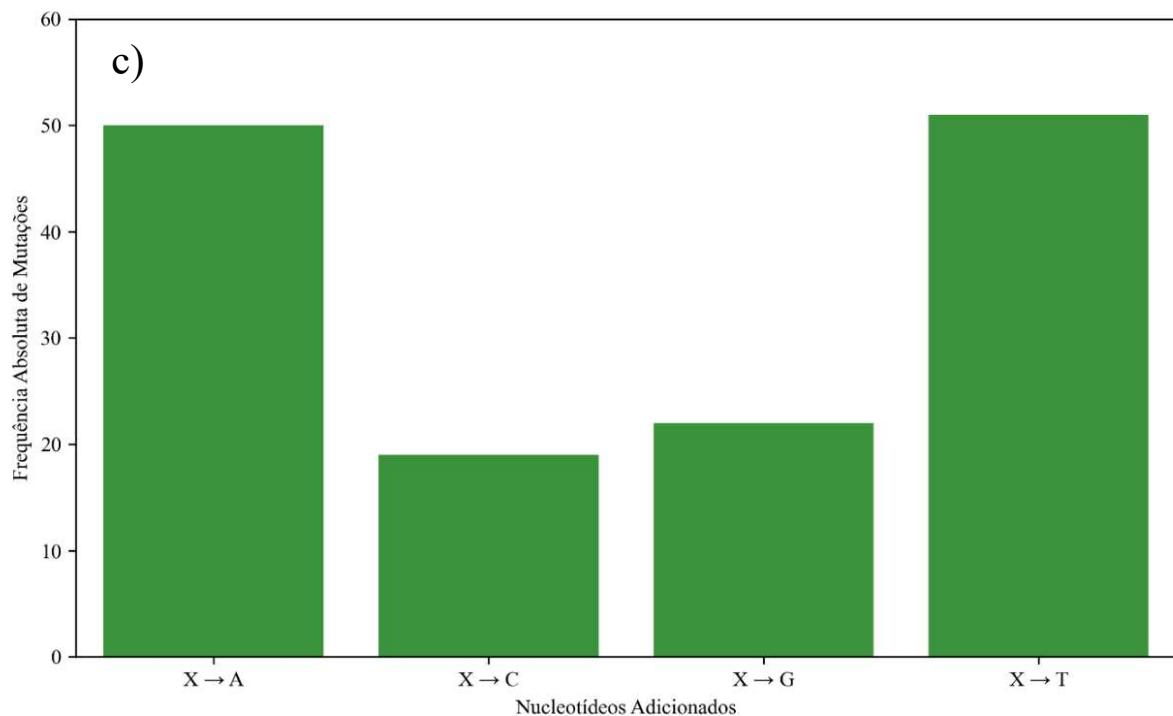


Fonte: Elaborado pelo autor. As barras em azul (a), laranja (b) e verde (c) mostram as quantidades dos nucleotídeos substituídos nas condições 1, 2 e 3 de *epPCR*, respectivamente.

Apesar de adeninas e timinas terem sido mutadas em maior quantidade, a maioria das mutações gerou a substituição em adeninas e timinas, como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 – Frequência de nucleotídeos substituídos no gene *ansZ* em cada condição de *epPCR*





Fonte: Elaborado pelo autor. As barras em azul (a), laranja (b) e verde (c) mostram as quantidades dos nucleotídeos substituídos nas condições 1, 2 e 3 de *epPCR*, respectivamente.

As sequências foram analisadas em *software* Bioedit e revelaram diferentes taxas de mutação como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Taxas de mutação no gene *ansZ* obtidas em cada condição de amplificação por *epPCR*

Condição	[MnCl ₂]	Mutações no DNA	Taxa de mutações no DNA	Mutações na proteínas (352aa)	Taxa de mutações na proteína
1	0,25 mM	9,7	0,92% ± 0,25%	6,1	1,74% ± 0,67%
2	0,35 mM	10,7	1,02% ± 0,48%	6,5	1,85% ± 0,91%
3	0,50 mM	17,7	1,68% ± 0,60%	11	3,13% ± 1,42%

Fonte: Elaborado pelo autor. O número de mutações reflete a média das oito sequências analisadas para cada condição presentes na região codificante do gene *ansZ* (1059 pb). O desvio-padrão também está representado. O programa utilizado para alinhamento foi BioEdit.

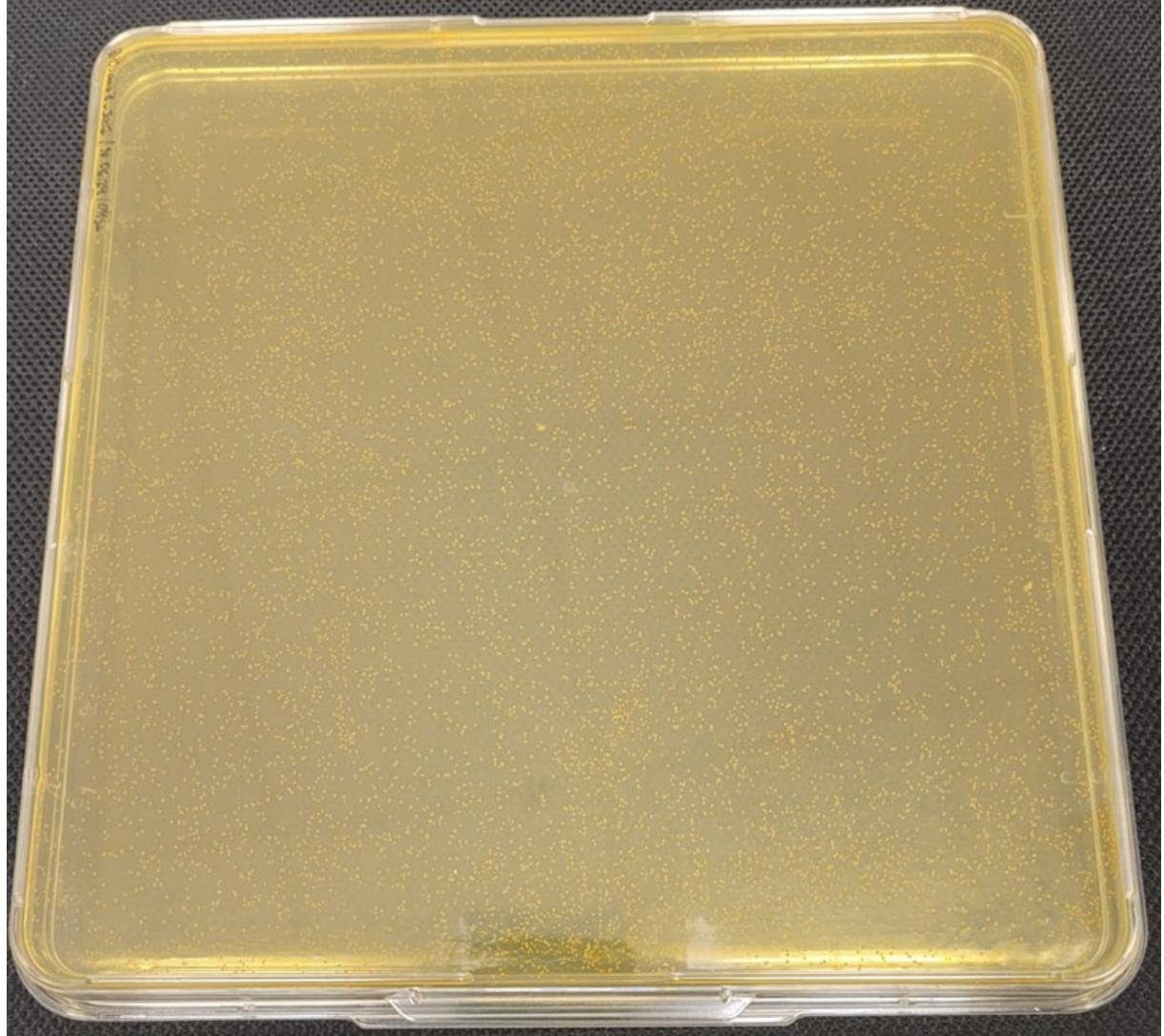
As mutações foram crescentes, conforme a concentração de manganês utilizada foi maior. Isto era previsto pois, conforme já descrito (BECKMAN; MILDVAN; LOEB, 1985), a presença do manganês como cofator enzimático permite a inserção de nucleotídeos errôneos, já que este íon promove interações com o nucleotídeo inserido, estabilizando-o, mesmo que não

esteja pareado com sua base nitrogenada complementar. Além do manganês, a DNA polimerase utilizada (GoTaq), não possui alta fidelidade garantida nem sítio exonucleásico corretor, garantindo que mutações pontuais adicionadas não sejam corrigidas. A taxa de mutação escolhida para a construção da biblioteca foi referente a condição 2 (aproximadamente 1%), por ser uma taxa intermediária e próxima aquelas utilizadas nos trabalhos envolvendo evolução dirigida de proteínas (CADWELL; JOYCE, 1992), sendo capazes de gerar uma quantidade de mutações suficiente para gerar diversidade gênica. A condição 3 não foi utilizada pois, apresenta uma taxa mais elevada de mutações, podendo comprometer a atividade e a estabilidade da proteína.

6.4 Construção da biblioteca nº 1 de mutantes aleatórios de BsAI

A reação de ligação da condição 2 no vetor RPC foi transformada em *E. coli* (DH5 α) eletrocompetentes com sucesso. A clonagem do gene *ansZ* em vetor RPC permite que os produtos de *epPCR* amplificados sejam contemplados na biblioteca. Portanto, uma alta eficiência de clonagem e alta competência garante que um grande volume de produtos de *epPCR* sejam inseridos em bactérias, aumentando o tamanho da biblioteca de mutantes. Quanto mais clones, maior a diversidade e, consequentemente, maior a probabilidade de haver variantes de L-ASNases com atividade asparaginásica. A contagem de colônias, considerando os fatores de diluição aplicados, permitiu inferir que o tamanho total da biblioteca construída foi de 2,5 x 10⁵ células, como mostrado na Figura 14.

Figura 14 – Colônias da biblioteca de mutantes de BsAII construída a partir da condição 2 da *epPCR*

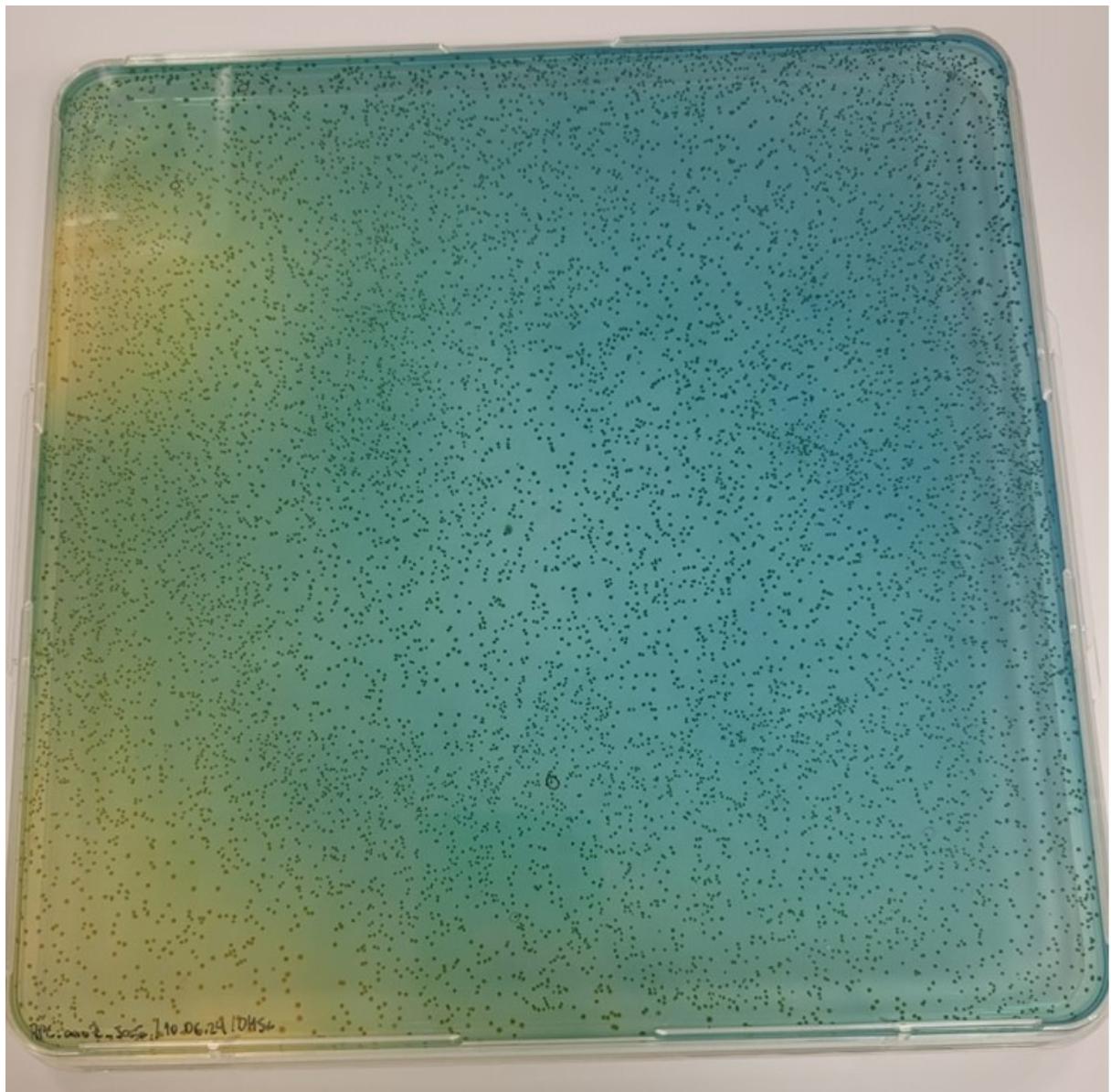


Fonte: Elaborado pelo autor. Biblioteca de mutantes aleatórios de BsAII com $2,5 \times 10^5$ colônias. A biblioteca foi preparada utilizando como base a condição 2 da *epPCR*.

O meio de cultura LB ágar, a pH 5,5, suplementado com L-Asn e corante BTB possibilitou um *screening* inicial diretamente na placa. Assim como apresentado por Mahajan *et al.* (2013) aproveitou-se da mudança de pH, devido a liberação de amônia no meio, para identificar colônias produtoras de L-asparaginase extracelular. Isso só foi possível graças ao vetor RPC, onde o gene *ansZ* está clonado, que permitiu a exportação da enzima para o meio extracelular e possibilitou a catálise de L-Asn no meio. A medida que o substrato foi consumido ocorreu a liberação da amônia, basificando o meio. O azul de bromotimol é um corante que se encontra na cor amarelada em pH ácido e migra para a cor azul ao se tornar mais básico, permitindo identificar colônias produtoras de L-asparaginases extracelulares ativas. Dessa

forma, entre 24h e 40h, os clones com atividade asparaginásica foram identificadas pela mudança de cor em torno delas, como observado na Figura 15.

Figura 15 – Uso do corante azul de bromotimol em meio sólido como método de *screening* de L-ASNases recombinantes extracelulares



Fonte: Elaborado pelo autor. Após a basificação do meio devido a liberação de amônia é possível observar a mudança de cor em volta das colônias e identificar L-ASNases mutantes com atividade asparaginásica.

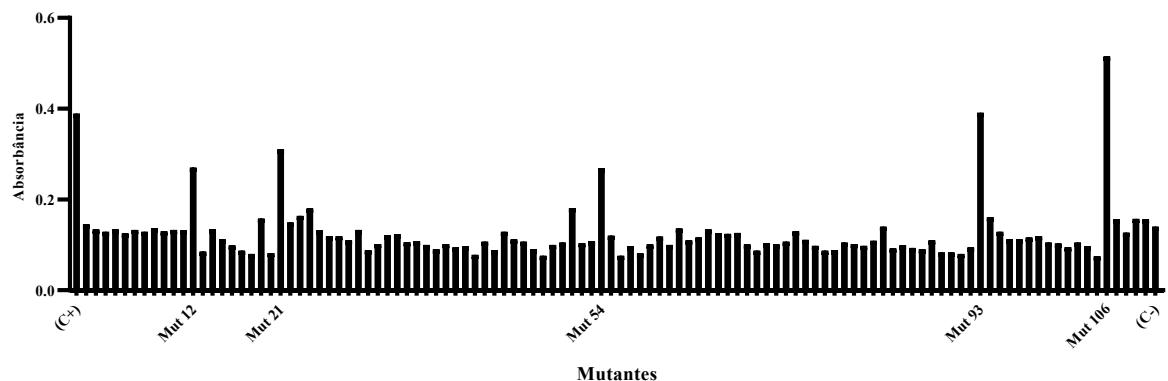
No trabalho de Mahajan *et al.* (2013), a degradação de Asn ao redor das colônias levava ao aparecimento de um halo de cor azul, indicando que a bactéria produziu L-asparaginase extracelular. Entretanto, esse fenômeno não foi observado de forma tão evidente nesta biblioteca e dessa forma, foram selecionadas 110 colônias que apresentaram uma

coloração azul mais escura dentre as demais, que poderia indicar uma atividade L-asparaginásica maior, mesmo sem a presença de halos. Esses mutantes foram selecionados para prosseguir com um teste de atividade pelo método da indoxina.

6.5 Seleção dos mutantes da biblioteca nº 1 com maior atividade asparaginásica

Após a etapa de *screening* em placa, os mutantes selecionados passaram por uma segunda etapa de *screening* através da medida de atividade de hidrólise de asparagina pelo método da indoxina. Os resultados do ensaio de atividade realizado com os mutantes selecionados da primeira biblioteca revelaram 5 mutantes que apresentaram uma atividade similar a BsAII nativa, como pode ser observado na Figura 16.

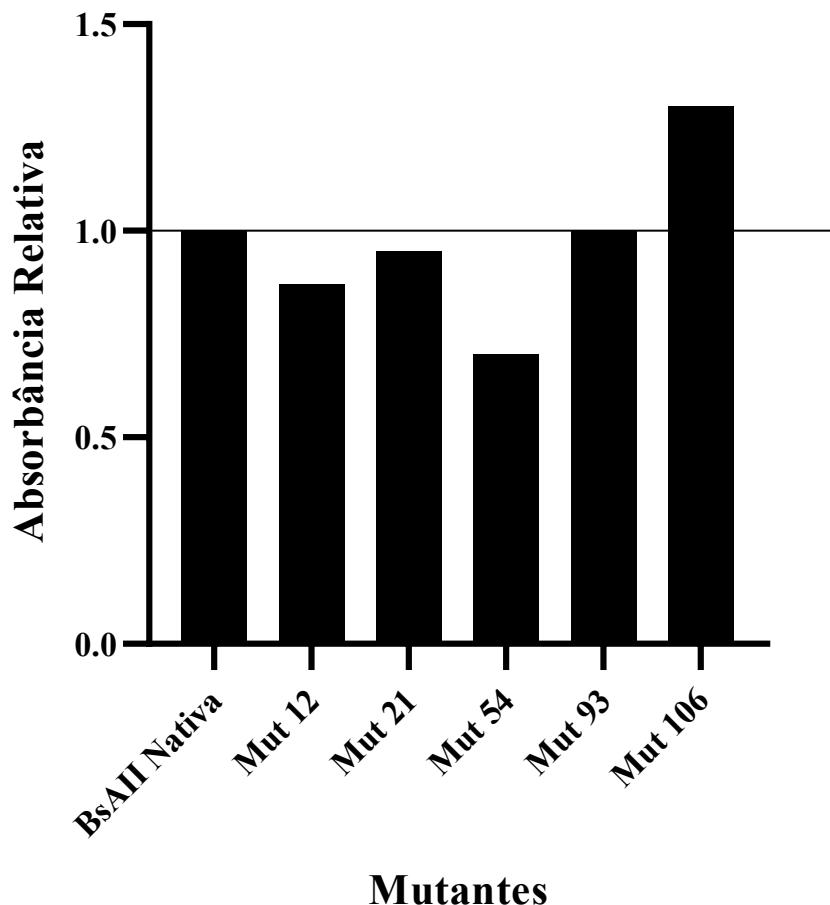
Figura 16 – Ensaio de atividade enzimática por indoxina das BsAII mutantes selecionados da biblioteca nº 1



Fonte: Elaborado pelo autor. Ensaio de atividade enzimática pelo método da indoxina com os mutantes selecionadas da primeira biblioteca (Condição 2). C+: BsAII nativa (RPC_ansZ_HisN). C-: Endoglucanase. Os mutantes que foram selecionados pelo ensaio, por apresentarem uma absorbância próxima a nativa, estão indicadas no eixo X.

O método da indoxina da Figura 15 revelou 5 mutantes com absorbância próxima a BsAII nativa (12, 21, 54, 93 e 106). A grande quantidade de clones com baixa atividade pode indicar que o método de *screening* não funcionou corretamente e que a quantidade de mutações deletérias foi elevada. A absorbância relativa destes mutantes em relação a BsAII nativa pode ser vista na Figura 17.

Figura 17 – Absorbância relativa dos mutantes selecionados da biblioteca nº 1 em relação a BsAII nativa a partir do ensaio da indoxina



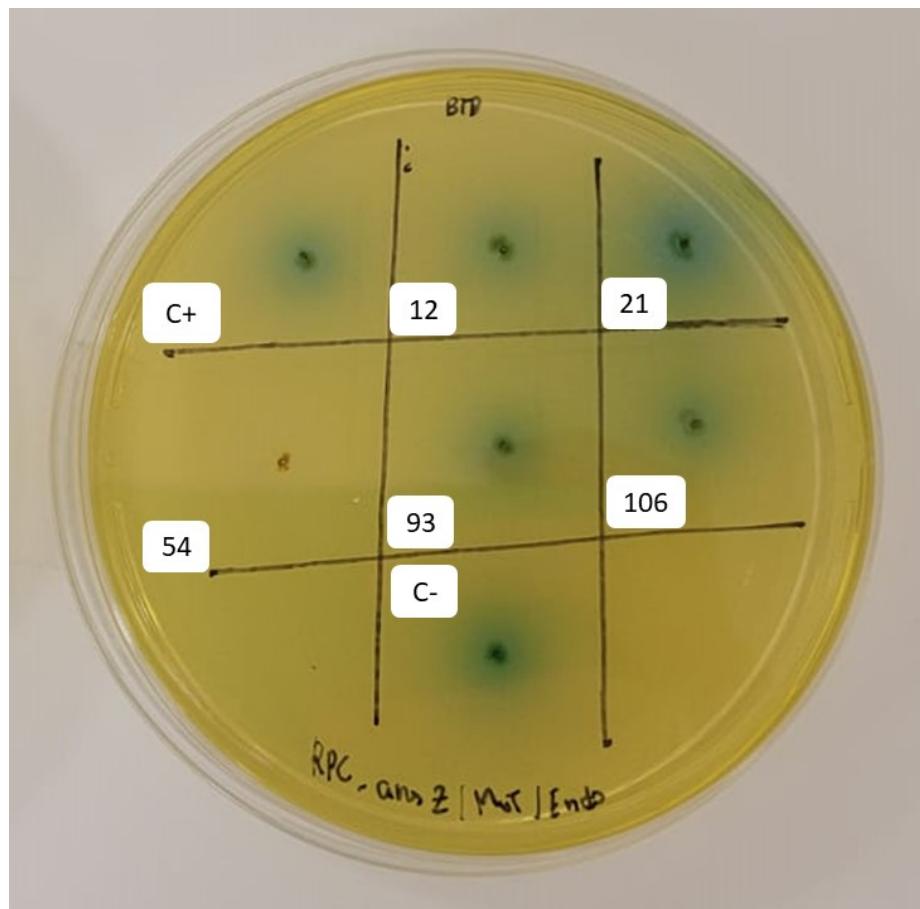
Fonte: Elaborado pelo autor. As absorbâncias relativas são calculadas dividindo a medida de absorbância dos mutantes pela absorbância da enzima nativa. Apenas o mutante 106 ultrapassou a absorbância da BsAII nativa.

Com base na Figura 16, apenas os mutantes 93 e 106 apresentaram uma absorbância igual ou superior a enzima nativa. Entretanto, como este ensaio não é normalizado (não possui curva padrão), foi necessário realizar um ensaio enzimático com a proteína purificada para confirmar os valores reais de atividade. A elevada absorbância de determinados mutantes no ensaio da indoxina pode indicar uma carga bacteriana maior e consequentemente mais enzima no caldo livre de células, sem necessariamente indicar uma atividade asparaginásica maior. Dessa forma, esses mutantes foram escolhidos para serem clonados no vetor de expressão pET28a. Antes da clonagem estes mutantes foram sequenciados para garantir que não se tratavam de L-asparaginase nativa.

Após a realização do ensaio da indoxina, colônias produtoras de L-asparaginase foram inoculadas em placa de LB ágar contendo apenas Azul de bromotímol. Os resultados deste teste levaram a acreditar que a mudança de cor no meio estava sendo influenciado ou causado pelo próprio metabolismo da bactéria, e não necessariamente pela produção de L-

asparaginase, como pode-se observar na Figura 18.

Figura 18 – Efeito do metabolismo da *E. coli* em meio LB ágar com Azul de Bromotimol



Fonte: Elaborado pelo autor. Colônias inoculadas em meio LB ágar com BTB. C+: BsAII nativa, nº 12,21,54,93,106: BsAII mutantes selecionados da biblioteca que apresentaram atividade no teste da indoxina , C: Colônia expressando uma enzima não-relacionada (Endoglucanase).

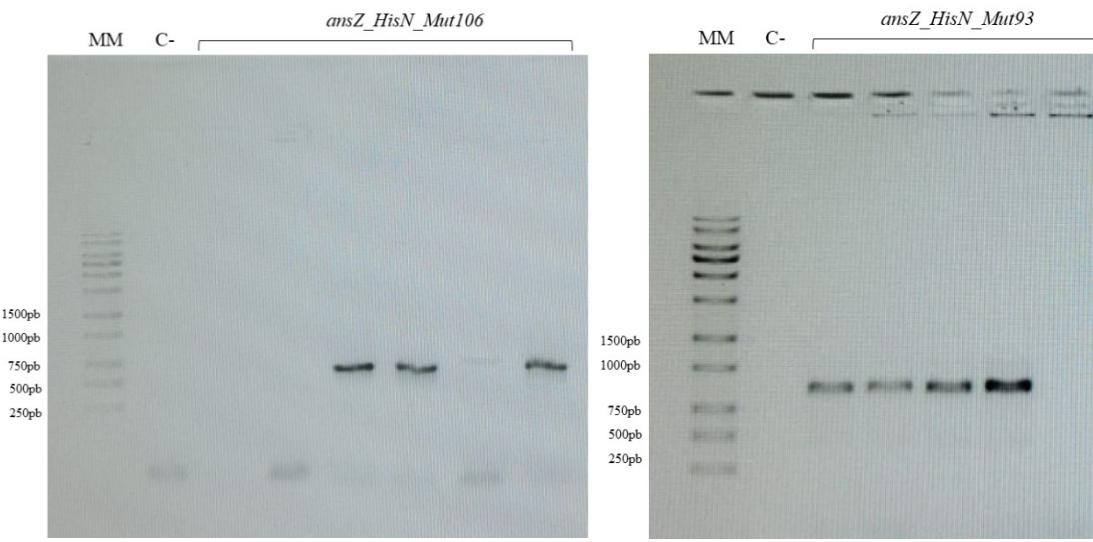
A Figura 17 evidencia que o metabolismo da bactéria também é responsável por basificar o meio, impossibilitando afirmar que aparecimento de cor azul em torno das colônias na biblioteca foi decorrente da liberação de amônia pela catálise de Asn.

6.6 Clonagem dos mutantes selecionados da biblioteca nº 1 em vetor pET28a

Os mutante 93 e 106 (biblioteca nº 1) selecionados por meio das etapas de *screening* foram clonados em pET28a. Para isso, tanto os insertos quanto o vetor foram digeridos com as mesmas enzimas (*NheI* e *BamHI*), produzindo extremidades coesivas para garantir a orientação correta durante a realização da reação de ligação, formando plasmídeos pET_*ansZ*. As células de *E. coli* DH5 α apresentaram bom crescimento em placa de LB ágar. Foi realizada a PCR de

colônia, selecionando-se colônias aleatórias para a amplificação do gene de interesse. Como é mostrado na Figura 19, as placas das duas construções apresentaram colônias positivas para a presença do gene da BsAII.

Figura 19 – Géis de agarose mostrando a PCR de colônia das culturas de *E. coli* transformadas com gene de BsAII mutante



Fonte: Elaborado pelo autor. Géis de agarose 1% mostrando a presença dos genes amplificados pelas PCRs de colônia provenientes das placas com bactérias transformadas com genes contendo a sequência dos mutantes selecionados da biblioteca nº 1, capturados no equipamento iBright FL1000. A indicação dos genes está mostrado acima das raias. MM: marcador de peso molecular (1kb DNA ladder ((LGC Biotecnologia®))), C- : controles negativos das amplificações.

A extração dos plasmídeos das bactérias positivas cultivadas em meio líquido permitiu a obtenção de material genético, que foram sequenciados e transformados em cepas de *E. coli* (BL21) para expressão.

6.7 Expressão e purificação das BsAII recombinantes da biblioteca nº 1

As sequências obtidas através do sequenciamento foram submetidas a análise no portal online ExpASy, com utilização dos recursos Translate e ProtParam para a obtenção da sequência polipeptídica traduzida, da massa molecular do monômero, do pI teórico e do coeficiente de extinção molar das proteínas recombinantes. As sequências traduzidas dos monômeros das enzimas recombinantes e suas características estão sumarizadas no Quadro 5.

Quadro 5 – Sequências polipeptídicas, massa molecular, pI teórico e coeficiente de extinção

molar das L-ASNases II recombinantes

BsAII Nativa

**MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASPETKESPKEKAQTQKVSSASASEKKDLPNIRILA
TGGTIAGADQSKTSTTEYKAGVVGVESLIEAVPEMKDIANVSGEQIVNVGSTNIDNK
ILLKLAKRINHLLASDDVDGIVVTHGTDLEETAYFLNLTVKSDKPVVIVGSMRPST
AISADGPSNLYNNAVKVAGAPEAKGKGTLVVLNDRIASARYVTKTNTTTDFKSEE
MGFVGTIADDIYFNNEITRKHTKDTDFSNSNLDELPQVDIYGYQNDGSYLFDAAVK
AGAKGIVFAGSGNGSLSDAEKGADSAVKKGVTVRSTRTGNGVVTPNQDYAEKD
LLASNSLNPQKARMMLMLALTKTNDPQKIQAYFNEY**

Massa molecular: 39915,73 Da	pI teórico: 6.22	Coeficiente de Extinção Molar: 16390 M ⁻¹ cm ⁻¹
---------------------------------	---------------------	--

BsAII - Mut 93 (K15N/T35S/N321Y)

**MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASHHHHHHPETKESPKEKAQTQNVSSASASEKK
DLPNIRILA**S**GTTIAGADQSKTSTTEYKAGVVGVESLIEAVPEMKDIANVSGEQIVN
VGGSTNIDNKILLKLAKRINHLLASDDVDGIVVTHGTDLEETAYFLNLTVKSDKPV
VIVGSMRPSTAISADGPSNLYNNAVKVAGAPEAKGKGTLVVLNDRIASARYVTKTN
TTTTDFKSEEMGFVGTIADDIYFNNEITRKHTKDTDFSNSNLDELPQVDIYGYQN
DGSYLFDAAVKAGAKGIVFAGSGNGSLSDAEKGADSAVKKGVTVRSTRTGNG
VVTPNQDYAEKDLLAS**Y**SLNPQKARMMLMLALTKTNDPQKIQAYFNEY**

Massa molecular: 40759,55 Da	pI teórico: 6.34	Coeficiente de Extinção Molar: 17880 M ⁻¹ cm ⁻¹
---------------------------------	---------------------	--

BsAII - Mut106 (N29T/K171I/D213V/K291E)

**MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASHHHHHHPETKESPKEKAQTQKVSSASASEKK
DLPT**I**RILATGGTIAGADQSKTSTTEYKAGVVGVESLIEAVPEMKDIANVSGEQIVN
VGGSTNIDNKILLKLAKRINHLLASDDVDGIVVTHGTDLEETAYFLNLTVKSDKPV
VIVGSMRPSTAISADGPSNLYNNAVKVAGAPEA**I**GKGTLVVLNDRIASARYVTKNT
TTTDFKSEEMGFVGTIA**V**DIYFNNEITRKHTKDTDFSNSNLDELPQVDIYGYQND
GSYLFDAAVKAGAKGIVFAGSGNGSLSDAEKGADSAV**K**EGVTVRSTRTGNG
VTPNQDYAEKDLLASNSLNPQKARMMLMLALTKTNDPQKIQAYFNEY**

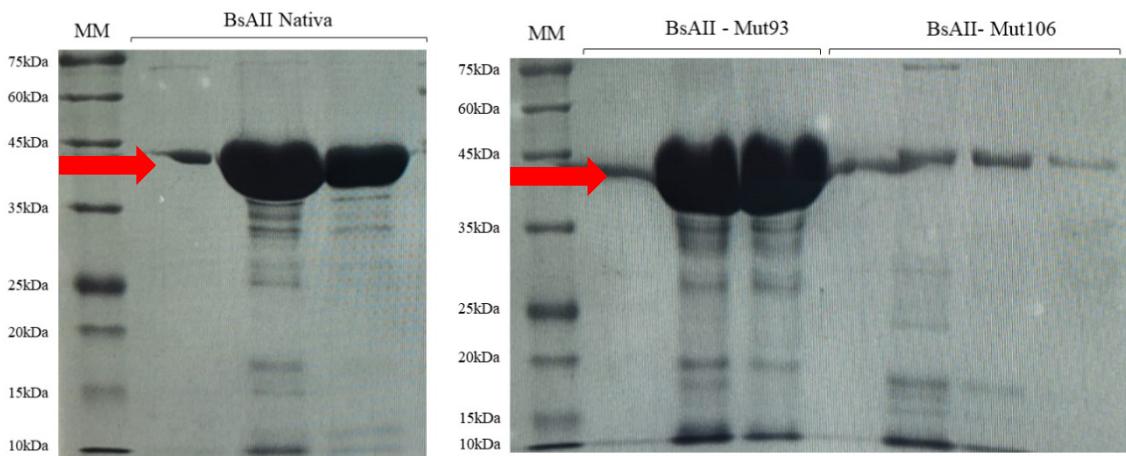
Massa molecular: 40695,55 Da	pI teórico: 6.24	Coeficiente de Extinção Molar: 16390 M ⁻¹ cm ⁻¹
---------------------------------	---------------------	--

Fonte: o autor. Sequências polipeptídicas das enzimas recombinantes e seus valores de massa molecular, pI teórico e coeficiente de extinção molar analisados nas ferramentas ExPASy Translate e ExPASy ProtParam, com destaque para a sequência sinal em azul, para a cauda de histidina em vermelho e para as mutações pontuais em laranja.

Como pode ser observado no Quadro 5, os mutantes apresentam duas caudas His no início da sequência. Isso aconteceu pois o inserto com cauda His na posição N-terminal (inserida na amplificação da *epPCR*) foi subclonado em pET28a, que já inclui uma cauda na sua sequência. Embora não se saiba determinar se isso afetou a purificação ou atividade da enzimas, esta condição foi evitada nas futuras clonagens. A expressão das enzimas recombinantes foi avaliada em frascos em shaker, utilizando-se caldo LB, com a obtenção dos

perfis de expressão intracelular, como mostrado nos géis de eletroforese apresentados na Figura 20.

Figura 20 – Géis de poliacrilamida mostrando a expressão intracelular das BsAII recombinantes selecionadas da biblioteca nº 1



Fonte: o autor. Géis de poliacrilamida 12,5% da eletroforese da expressão intracelular das construções de BsAII , capturados no equipamento iBright FL1000. As bandas na altura correspondente ao peso molecular estimado do monômero da BsAII (40,0 kDa) estão apontadas pela seta vermelha. MM: Marcador de peso molecular (*TrueColor High Range Protein Marker*). A indicação das frações de proteínas eluídas com imidazol no sistema de cromatografia líquida *AKTA pure™* está mostrado acima das raias.

A análise dos geis mostra que a BsAII nativa e o mutante 93 expressaram mais que o mutante 106. A baixa quantidade de proteínas do mutante 106 pode ser justificado por influência das mutações na expressão, dobramento e solubilidade da proteína. Testes adicionais ainda são necessários para justificar essa diferença de expressão.

6.8 Quantificação e atividade enzimática das BsAII recombinantes da biblioteca nº 1

A quantificação das L-ASNases II recombinantes expressas em pET28a foram realizadas em Nanodrop e o ensaio de atividade enzimática pelo método de Nessler foi realizado utilizando 1 μ M de cada enzima. Os dados obtidos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração e atividade enzimática das BsAII recombinantes selecionadas da biblioteca nº 1

Enzima	Concentração (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)*
--------	----------------------	------------------------------

BsAII Nativa	$9,19 \pm 0,14$	$71,64 \pm 0,94$
BsAII-Mut 93	$13,29 \pm 0,21$	$23,73 \pm 1,09$
BsAII-Mut 106	$0,50 \pm 0,02$	$6,46 \pm 0,63$

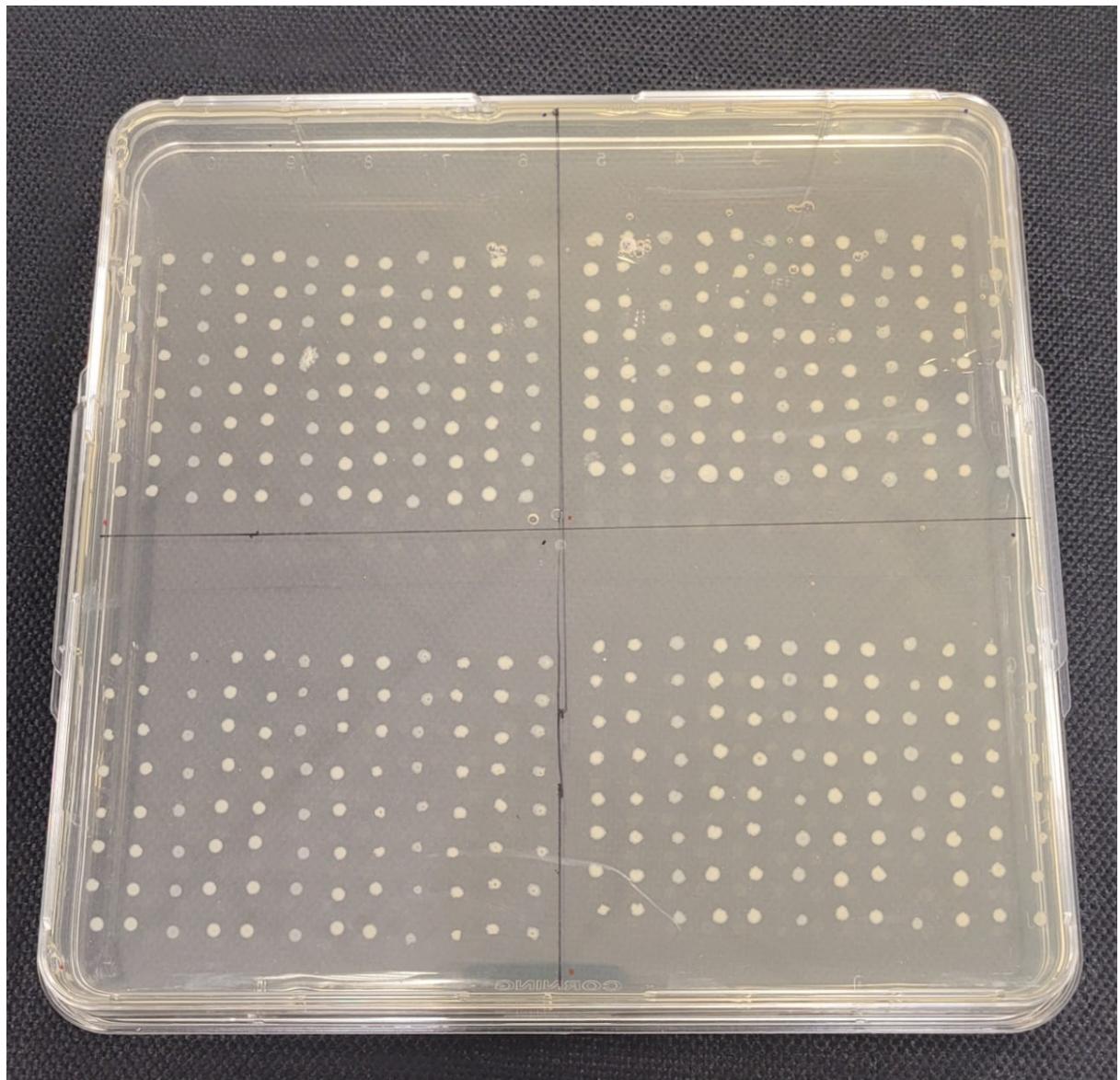
Fonte: Elaborado pelo autor. Concentração de BsAII recombinante expressa em pET28a e atividade enzimática das L-ASNases. A atividade enzimática foi medida utilizando a concentração de 1 μM , equivalente a 0,04 mg/ml de proteína*.

Os valores da Tabela 4 evidenciam que, para a mesma concentração de enzima, a BsAII Nativa possui mais atividade asparaginásica em relação aos mutantes. Os mutantes 93 e 106 oriundos da biblioteca n° 1 obtiveram, aproximadamente, 33% e 9% da atividade da enzima nativa. A medida da atividade asparaginásica das enzimas purificadas consiste na terceira etapa de *screening* do processo de evolução dirigida da L-asparaginase II de *Bacillus subtilis*. Os dois mutantes tiveram uma atividade inferior em relação a enzima nativa, sendo necessário realizar o *screening* de mais mutantes a fim de prospectar mutantes de maior eficiência catalítica.

6.9 Construção da biblioteca n° 2 de mutantes aleatórios de BsAII

Como o primeiro método de *screening* não foi muito eficiente, uma segunda biblioteca foi construída para utilizar outro método de rastreamento e seleção em meio sólido. Desta foram selecionadas aleatoriamente 384 colônias e crescidas em placa de Petri 15x15cm, como mostrado na Figura 21.

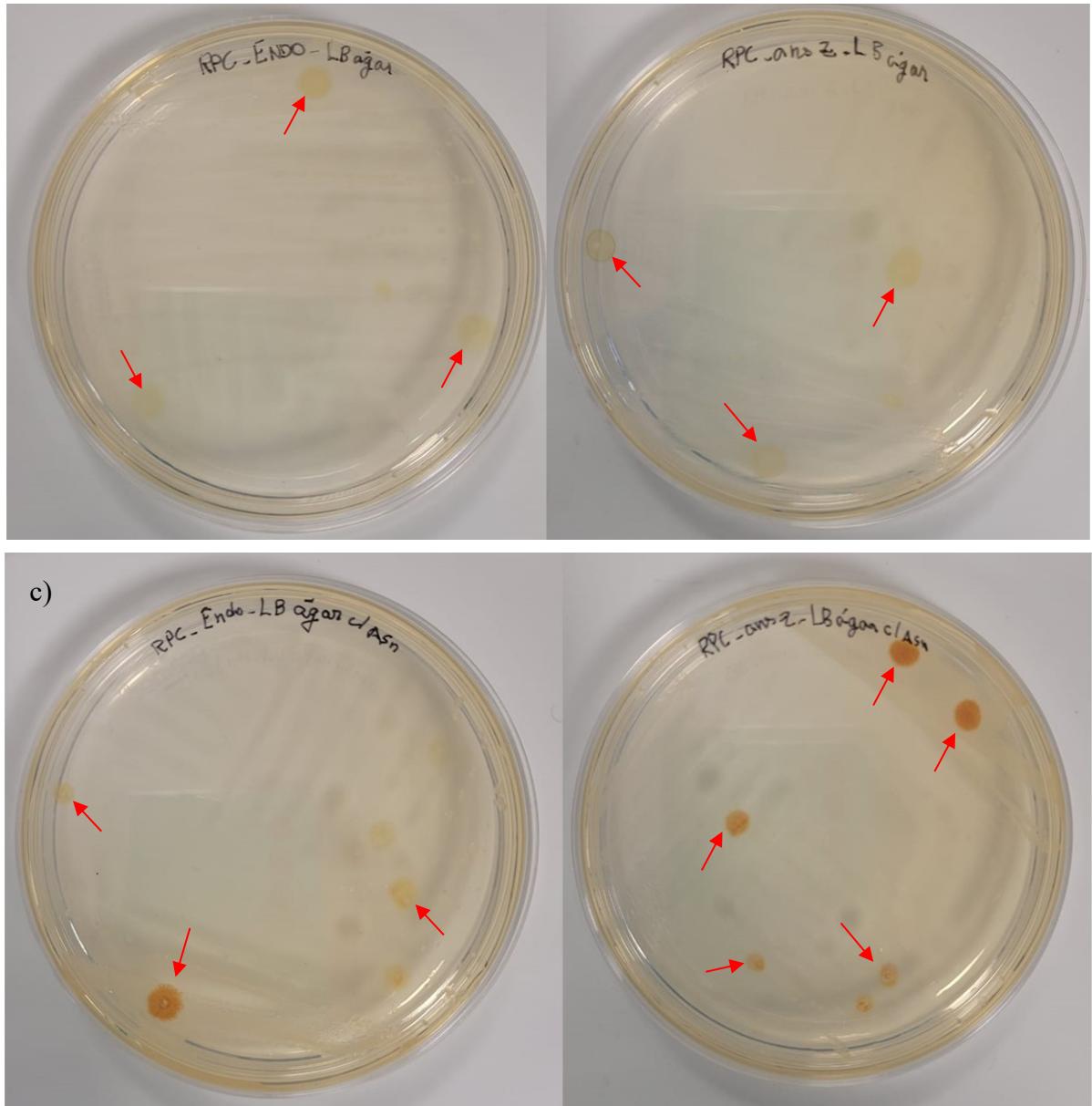
Figura 21 – Colônias de *E. coli* transferidas da biblioteca de mutantes de BsAII construída a partir da condição 1 da *epPCR*



Fonte: Elaborado pelo autor. Placa contendo colônias transferidas da biblioteca de mutantes aleatórios de BsAII. A biblioteca foi preparada utilizando como base a condição 1 da *epPCR*.

Assim como foi feito na biblioteca nº 1 o objetivo foi identificar colônias produtoras de L-asparaginase extracelular, por meio do consumo de L-Asn no meio. Entretanto, desta vez utilizou-se o reagente de Nessler (SHIFRIN; PARROTT; LUBORSKY, 1974) para identificar a mudança de cor em volta da colônia devido a liberação da amônia decorrente da hidrólise de L-Asn. Para validar este método de *screening* foram realizados testes anteriores utilizando placas de LB ágar com e sem L-Asn no meio, como observado na Figura 22.

Figura 22 – Ensaio de Nessler em meio sólido como método de screening de L-ASNases recombinantes extracelulares

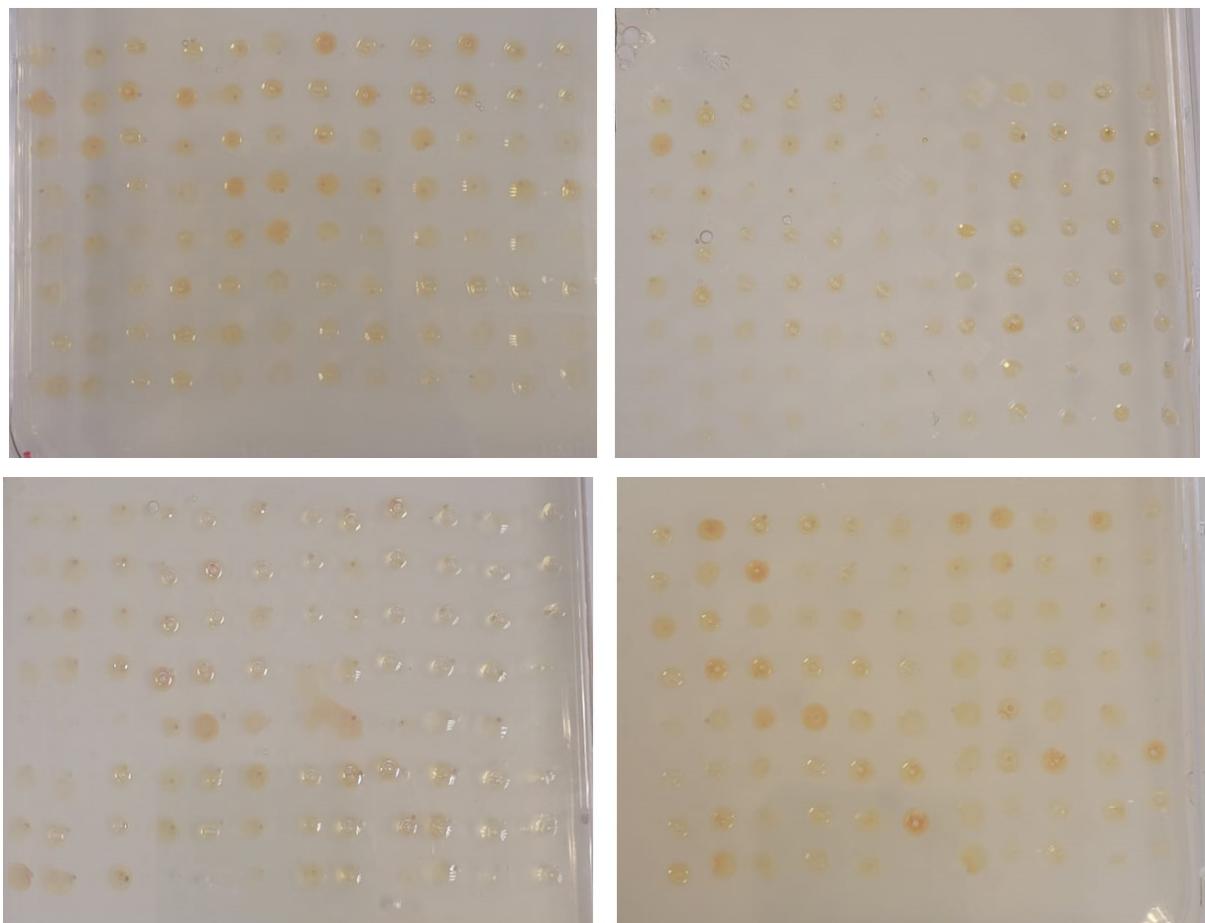


Fonte: Elaborado pelo autor. a) Placa de LB ágar sem L-Asn contendo colônias produtoras de endoglucanase (Vetor RPC_endo), b) Placa de LB ágar sem L-Asn contendo colônias produtoras de BsAII nativa (RPC_ansZ), c) Placa de LB ágar com L-Asn contendo colônias produtoras de endoglucanase (Vetor RPC vazio), d) Placa de LB ágar sem L-Asn contendo colônias produtoras de BsAII nativa (RPC_ansZ). As setas vermelhas indicam colônias de bactérias onde o reagente de Nessler foi adicionado. As bactérias que produzem L-asparaginase degradam a L-Asn do meio e a amônia liberada reage com Nessler produzindo a cor laranja em volta da colônia.

As colônias nas placas sem L-Asn, Figura 22 (a) e Figura 22 b), não reagiram fortemente com o reagente de Nessler. Na placa contendo o aminoácido e as bactérias expressando endoglucanase, Figura 22 (c), as colônias isoladas também não apresentaram

mudança considerável de cor, exceto quando o reagente foi colocado em um aglomerado de células. Isso pode ter ocorrido devido a presença L-asparaginase endógena da própria *E. coli* ou devido a metabólitos das bactérias, fazendo com que o acúmulo de colônias tenha gerado reação. Por fim, na placa com L-Asn e bactérias RPC_ *ansZ*, Figura 22 (d), houve mudança de cor, deixando um aspecto alaranjado em torno das colônias. Dessa forma, o *screening* com Nessler possibilitou a seleção de clones que expressam L-asparaginase extracellular recombinante ativa, diferenciando-as, como mostra a Figura 23.

Figura 23 – *Screening* de mutantes de BsAII em placa utilizando reagente de Nessler para selecionar clones produtores de L-ASNase recombinante extracelular



Fonte: Elaborado pelo autor. Placa contendo colônias transferidas da biblioteca de mutantes aleatórios de BsAII. A biblioteca foi preparada utilizando como base a condição 1 da *epPCR*. A cor alaranjada indicam colônias de bactérias onde o reagente de Nessler foi adicionado e houve reação com a amônia liberada pelo consumo de L-Asn presente no meio. As bactérias que produzem L-asparaginase degradam a Asn do meio e a amônia liberada reage com Nessler produzindo a cor laranja em volta da colônia.

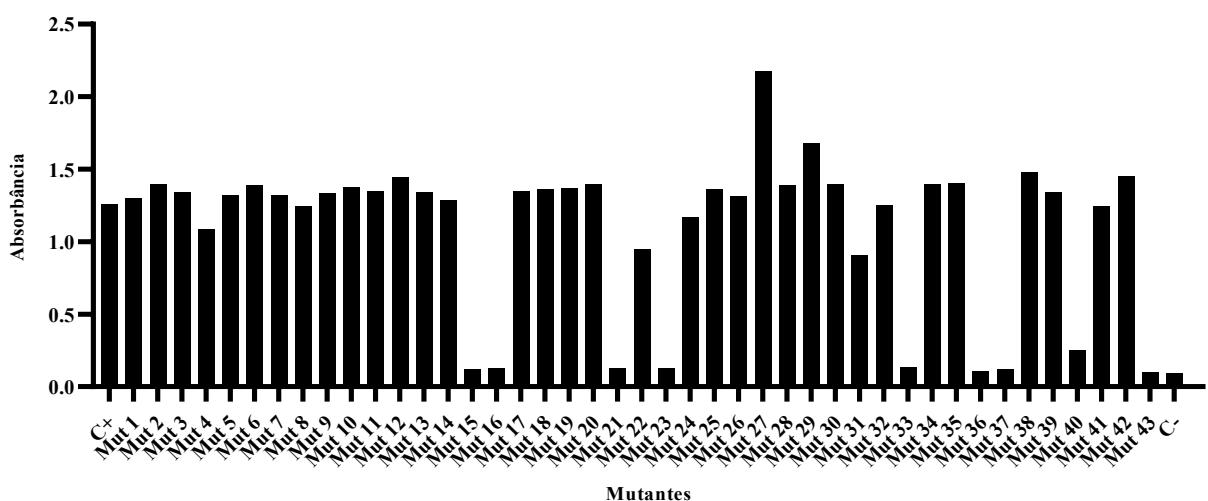
Como observado na Figura 23, nos quatro quadrantes da placa as colônias reagiram

de forma diferenciada ao Nessler. Algumas colônias apresentaram reação fraca (cor: amarelo fraco ou quase ausência de cor), outras apresentaram reação intermediária (cor: amarelo/laranja fraco), e algumas reagiram fortemente com Nessler (cor: laranja forte), possivelmente indicando que estas possuem atividade asparaginásica. Aquelas que apresentaram uma mudança de cor mais intensa foram selecionadas para prosseguir com o teste de atividade pelo método da indoxina, totalizando 43 possíveis mutantes.

6.10 Seleção dos mutantes da biblioteca nº 2 com atividade de hidrólise de asparagina

Após a etapa de *screening* em placa, os mutantes selecionados passaram por uma segunda etapa de medida da atividade de hidrólise de asparagina pelo método da indoxina. Os resultados do ensaio de atividade realizado com os mutantes selecionados da segunda biblioteca revelaram 35 mutantes que apresentaram atividade asparaginásica, como pode ser observado na Figura 24.

Figura 24 – Ensaio de indoxina dos mutantes de BsAII selecionados da biblioteca nº 2



Fonte: Elaborado pelo autor. Ensaio de atividade enzimática pelo método da indoxina com os clones selecionadas da segunda biblioteca (condição 1). C+: BsAII nativa (RPC_ansZ_HisN). C-: Endoglucanase.

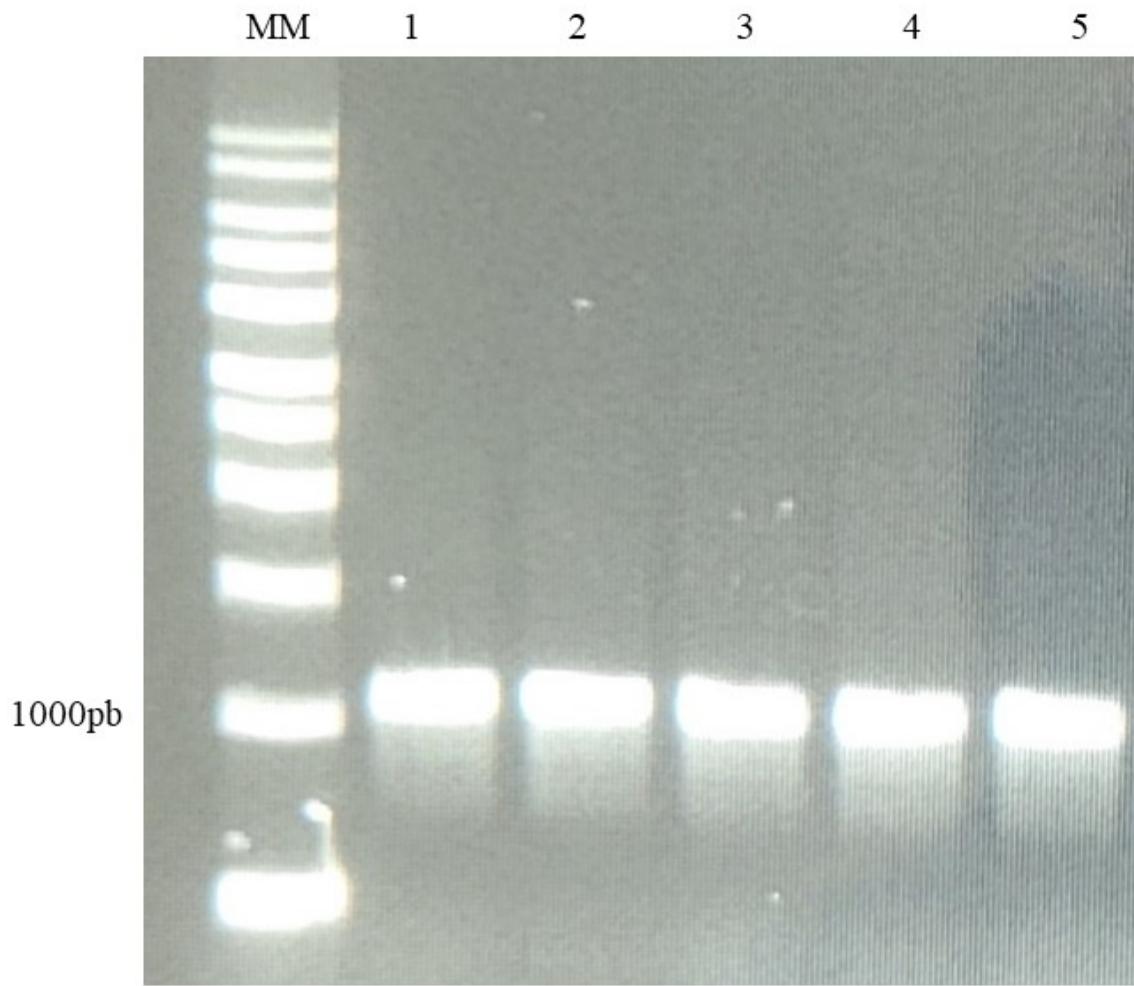
O ensaio de atividade enzimática com indoxina revelou 8 clones sem atividade enzimática (mutantes 15, 16, 21, 23, 33, 36, 37, 41 e 43), que foram então eliminados por esta etapa de *screening*. Enquanto o método de rastreamento por BTB empregado da biblioteca nº 1, que selecionou apenas 5 mutantes de um total de 110 clones (~5% de eficiência), o *screening*

utilizando Nessler conseguiu selecionar mais mutantes com Abs próxima a BsAII nativa. Em um total de 43 clones que foram previamente rastreados em placa, foram identificados 35 mutantes com atividade (~80% de eficiência).

Isso pode indicar que esta nova forma de *screening* em placa é mais eficaz, visto que a grande maioria dos clones selecionados pelo método apresentaram atividade. Por outro lado, a utilização da condição 1 ($Mn = 0,25\text{mM}$) na *epPCR* pode ter contribuído para isso, uma vez que gera uma taxa de mutação menor, diminuindo a probabilidade gerar mutações que comprometam a atividade da enzima. Todos os mutantes com absorbância próxima ao controle positivo foram sequenciados para verificar se algum deles se tratava da BsAII nativa. Foi observado que dentre os 35 clones, 5 não foram sequenciados com qualidade e 7 não apresentaram mutações, restando então 23 clones com mutações. A quantidade, a frequência e a natureza das mutações foram analisadas para decidir quais mutantes passariam para a próxima etapa de *screening*. Observou-se que a quantidade de mutações na sequência do gene *ansZ* foi menor (entre 1 e 3) em comparação aos clones identificados na primeira biblioteca (entre 5 e 8), que foi construída a partir da condição 2 de *epPCR*. Além disso, notou-se que algumas posições mutadas do gene *ansZ* se repetiam em diferentes clones, indicando que estas posições possivelmente sejam interessantes e possam influenciar de alguma forma nas propriedades da BsAII. Com base nisso, 4 mutantes foram escolhidos (mutantes 10, 14, 24, 26) para prosseguir com a expressão em pET28a.

Para evitar a presença de duas caudas His na proteína como ocorreu nos mutantes 93 e 106 da biblioteca nº 1, foi realizada uma PCR com enzima de alta fidelidade (*Phusion™ High Fidelity DNA polymerase*) para amplificar somente o gene *ansZ* com as mutações. Além disso, também foi realizada a PCR para o mutante 93 da biblioteca nº 1 afim de expressá-lo novamente em pET28a, sem a dupla cauda His. A amplificação do gene *ansZ* foi bem sucedida, como é mostrado pela presença das bandas no gel de agarose com marcação fluorescente na Figura 25.

Figura 25 – Gel de agarose evidenciando a amplificação dos genes *ansZ* por PCR de alta fidelidade



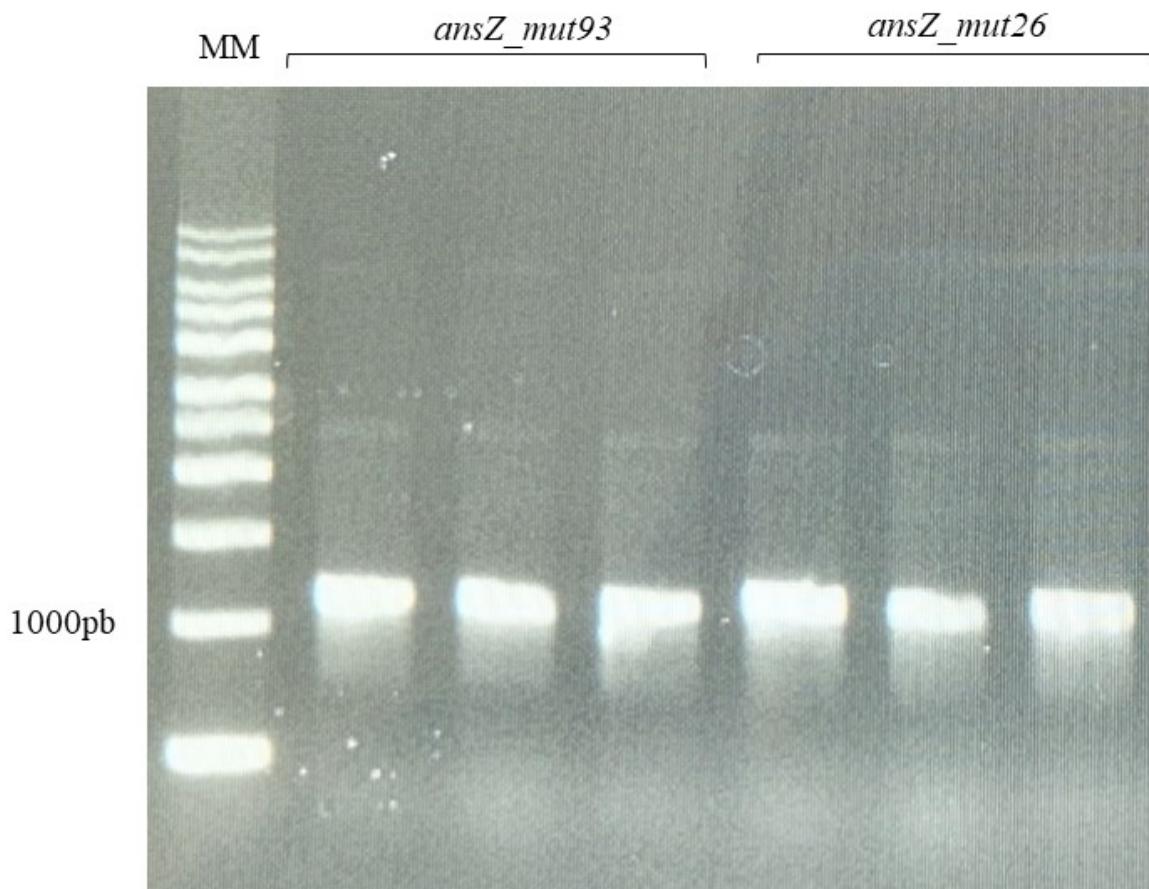
Fonte: Elaborado pelo autor. Gel de agarose 1% mostrando a presença dos genes amplificados pelas reações de PCR, capturados no equipamento iBright FL1000. MM: marcador de peso molecular (Sigma 1kb ladder), 1: *ansZ_mut10*, 2: *ansZ_mut14*, 3: *ansZ_mut24*, 4: *ansZ_mut26*, 5: *ansZ_mut93*.

A presença das bandas no gel da altura esperada, de aproximadamente 1000 pares de base, considerando também os primers utilizados, confirma que os genes amplificados são de fato os genes de interesse, mas não permite a confirmar a retirada da cauda de histidina nas sequências, por ser de tamanho pequeno para provocar alguma mudança significativa na posição das bandas no gel. Devido a isso, ao final da clonagem, o sequenciamento dos genes é necessário para averiguar esta questão.

Os mutantes 10, 14, 24 e 26 da biblioteca nº 2, e o mutante 93 da biblioteca nº 1 foram克隆ados em peET28a. Para isso, tanto os insertos quanto o vetor foram digeridos com as mesmas enzimas (*NheI* e *BamHI*), produzindo extremidades coesivas para garantir a orientação correta durante a realização da reação de ligação, formando plasmídeos pET_*ansZ*. As células de *E. coli* DH5α transformadas com o gene dos mutantes 26 e 93 apresentaram bom crescimento, enquanto os outros mutantes não cresceram, possivelmente devido a problemas

no processo de digestão e/ou transformação. A PCR de colônia foi realizada para atestar a presença do gene de interesse, selecionando-se colônias aleatórias para a amplificação do gene de interesse. Como é mostrado na Figura 26, as placas das duas construções apresentaram colônias positivas para a presença do gene da BsAII.

Figura 26 – Gel de agarose mostrando a PCR de colônia de *E. coli* transformadas com gene de BsAII mutante



Fonte: Elaborado pelo autor. Gel de agarose 1% mostrando a presença dos genes amplificados pela PCR de colônia provenientes das placas com bactérias transformadas com genes contendo a sequência dos mutantes selecionados , capturados no equipamento iBright FL1000. A indicação dos genes está mostrado acima das raias. MM: marcador de peso molecular (Sigma 1kb ladder).

Com a identificação de colônias positivas para a presença do gene da L-asparaginase II, realizou-se a seleção de três colônias de cada placa. A extração dos plasmídeos das bactérias cultivadas em meio líquido permitiu a obtenção de material genético, que foram sequenciados e transformados em cepas de *E. coli* (BL21) para expressão.

6.11 Expressão e purificação da BsAII nativa e dos mutantes selecionados

As sequências obtidas através do sequenciamento da L-ASNase nativa (BsAII nativa), do mutante selecionado através do método de *screening* nº 1 (BsAII-S1-Mut93) e do mutante selecionado através do método de *screening* nº 2 (BsAII-S2-Mut26) foram submetidas a análise no portal online ExpASy, com utilização dos recursos Translate e ProtParam para a obtenção da sequência polipeptídica traduzida, da massa molecular do monômero, do pI teórico e do coeficiente de extinção molar das proteínas recombinantes. As sequências traduzidas dos monômeros das enzimas recombinantes e suas características estão summarizadas no Quadro 6.

Quadro 6 – Sequências polipeptídicas, massa molecular, pI teórico e coeficiente de extinção molar da BsAII nativa e dos mutantes selecionados

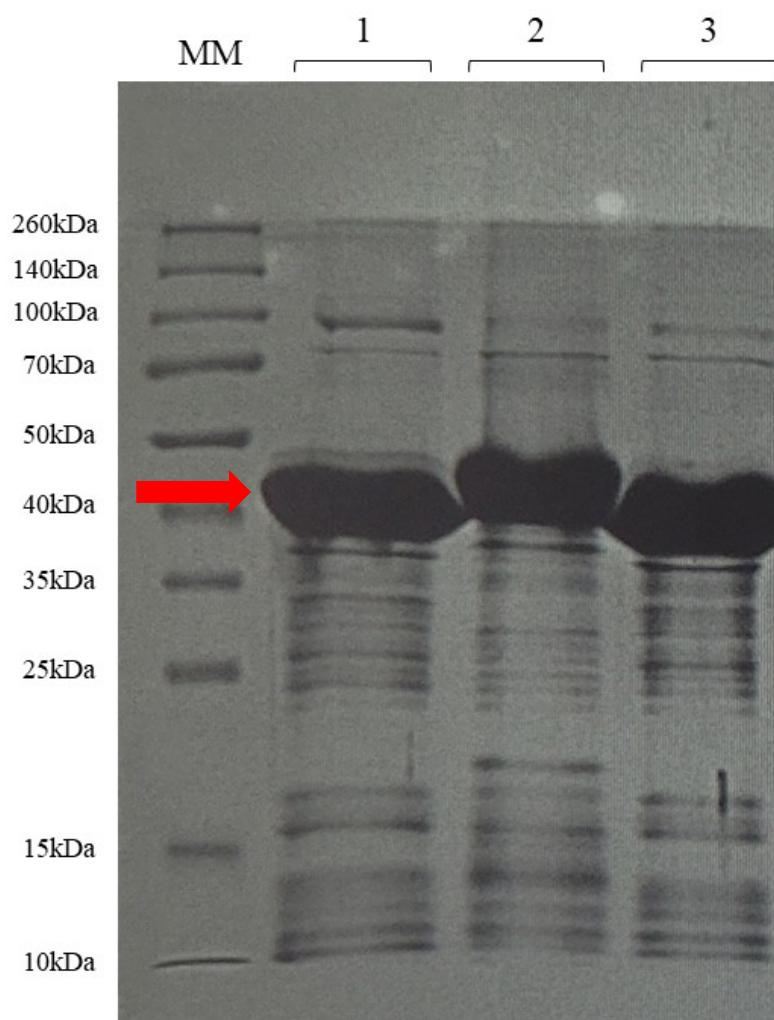
BsAII Nativa		
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASPETKESPKEKAQTQKVSSASASEKKDLPNIRILATGGTIAGADQSKTSTTEYKAGVVGVESLIEAVPEMKDIANVSGEQIVNVGSTNIDNKILLKLAKRINHLLASDDVDGIVVTHGTDLEETAYFLNLTVKSDKPVIVGSMRPSSTAISADGPSNLYNNAVKVAGAPEAKGKGTLVVLNDRIASARYVTKTNTTTDTFKSEEMGFVGTIAADDIYFNNEITRKHTKDTSVSNLDELPQVDIYGYQNDGSYLFDAAVKAGAKGIVFAGSGNGSLDAEKGADSAVKKGVTVRSTRTGNGVVTPNQDYAEKDLLASNSLNPQKARMMLALTKTNDPQKIQAYFNEY		
Massa molecular: 39915,73 Da	pI teórico: 6.22	Coeficiente de Extinção Molar: 16390 M ⁻¹ cm ⁻¹
BsAII-S1-Mut93 (K15N/T35S/N321Y)		
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASPETKESPKEKAQTQNVSASASEKKDLPNIRILASGGTIAGADQSKTSTTEYKAGVVGVESLIEAVPEMKDIANVSGEQIVNVGSTNIDNKILLKLAKRINHLLASDDVDGIVVTHGTDLEETAYFLNLTVKSDKPVIVGSMRPSSTAISADGPSNLYNNAVKVAGAPEAKGKGTLVVLNDRIASARYVTKTNTTTDTFKSEEMGFVGTIAADDIYFNNEITRKHTKDTSVSNLDELPQVDIYGYQNDGSYLFDAAVKAGAKGIVFAGSGNGSLDAEKGADSAVKKGVTVRSTRTGNGVVTPNQDYAEKDLLAS<color>Y</color>SLNPQKARMMLALTKTNDPQKIQAYFNEY		
Massa molecular: 39936,70 Da	pI teórico: 6.08	Coeficiente de Extinção Molar: 17880 M ⁻¹ cm ⁻¹
BsAII-S2-Mut26 (K70E/K136R/T222A)		
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASPETKESPKEKAQTQKVSSASASEKKDLPNIRILATGGTIAGADQSKTSTTEYKAGVVGVESLIEAVPEM<color>E</color>DIANVSGEQIVNVGSTNIDNKILLKLAKRINHLLASDDVDGIVVTHGTDLEETAYFLNLTVKSD<color>R</color>PVIVGSMRPSSTAISADGPSNLYNNAVKVAGAPEAKGKGTLVVLNDRIASARYVTKTNTTTDTFKSEEMGFVGTIAADDIYFNNE<color>IA</color>RKHTKDTSVSNLDELPQVDIYGYQNDGSYLFDAAVKAGAKGIVFAGSGNGSLDAEKGADSAVKKGVTVRSTRTGNGVVTPNQDYAEKDLLASNSLNPQKARMMLALTKTNDPQKIQAYFNEY		

Massa molecular: 39914,66 Da	pI teórico: 5.95	Coeficiente de Extinção Molar: 16390 M ⁻¹ cm ⁻¹
---------------------------------	---------------------	--

Fonte: Elaborado pelo autor. Sequências polipeptídicas das enzimas recombinantes e seus valores de massa molecular, pI teórico e coeficiente de extinção molar analisados nas ferramentas ExPASy Translate e ExPASy ProtParam, com destaque para a sequência sinal em azul, para a cauda de histidina em vermelho e para as mutações pontuais em laranja.

A expressão das enzimas recombinantes foi avaliada em frascos em shaker, utilizando-se caldo LB, com a obtenção dos perfis de expressão intracelular, como mostrado no gel de eletroforese apresentados na Figura 27.

Figura 27 – Gel de poliacrilamida mostrando a expressão intracelular das BsAII recombinantes



Fonte: o autor. Gel de poliacrilamida 12,5% da eletroforese da expressão intracelular das construções de BsAII. As bandas na altura correspondente ao peso molecular estimado do monômero da BsAII (40,0 kDa) estão apontadas pela seta vermelha. MM: Marcador de peso molecular (*Spectra Multicolor Broad Range Protein*

Ladder), 1:BsAII Nativa, 2: BsAII-S2-Mut26, 3: BsAII-S1-Mut93.

A Figura 27 mostra que tanto a nativa quanto os mutantes de BsAII expressaram bem e com tamanhos similares de banda, indicando que as mutações possivelmente não afetaram a expressão, dobramento ou solubilidade das proteínas.

6.12 Quantificação e atividade enzimática da BsAII nativa e dos mutantes

A quantificação das L-ASNases II recombinantes expressas em pET28a foram realizadas em Nanodrop e o ensaio de atividade enzimática pelo método de Nessler foi realizado utilizando 1 µM de cada enzima. Os dados obtidos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentração e atividade enzimática da BsAII nativa e dos mutantes selecionados

Enzima	Concentração (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
BsAII Nativa	2,33 ± 0,03	73,21 ± 4,16
BsAII-S1-Mut 93	2,13 ± 0,03	15,64 ± 0,31
BsAII-S2-Mut 26	3,54 ± 0,10	72,82 ± 0,47

Fonte: Elaborado pelo autor. Concentração de BsAII recombinante expressa em pET28a e atividade asparaginásica das L-ASNases. A atividade enzimática foi medida utilizando a concentração de 1 µM, equivalente a 0,04 mg/ml de proteína*.

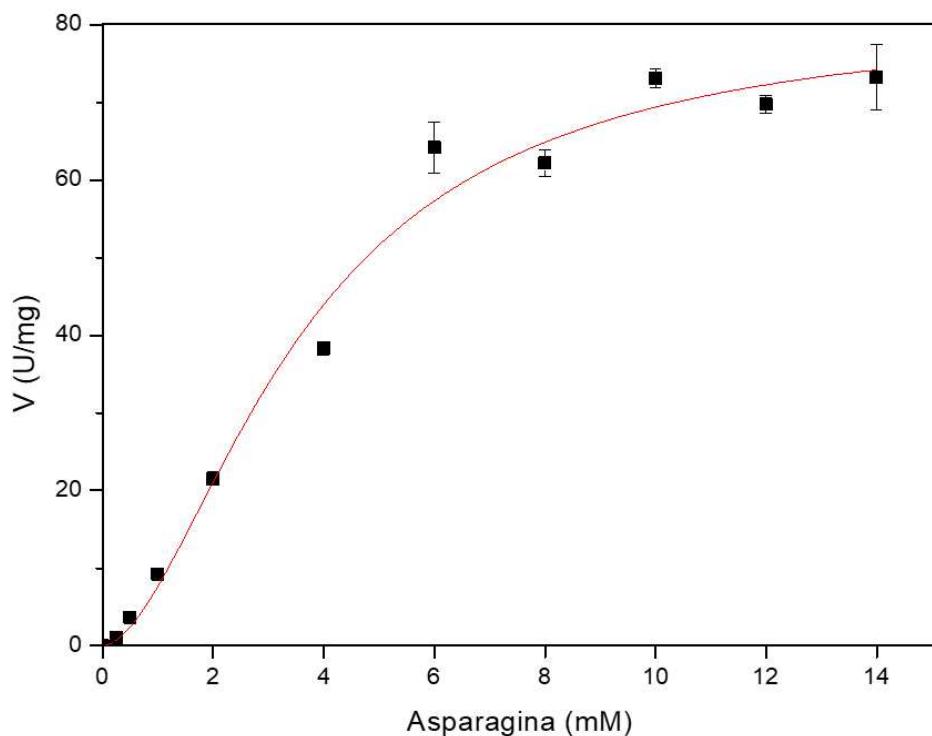
Os valores da Tabela 5 evidenciam que para a mesma concentração de enzima, a BsAII Nativa e o BsAII-S2-Mut26 possuem praticamente a mesma atividade asparaginásica, enquanto a da BsAII-S1-Mut93 foi 5 vezes menos que a enzima nativa. Com relação ao rendimento de expressão, a concentração ligeiramente maior do mutante 26 pode indicar influência das mutações no dobramento, solubilidade e produção da enzima. Testes adicionais ainda são necessários para justificar essa diferença de expressão.

6.13 Propriedades cinéticas das BsAII nativa e dos mutantes selecionados

As variantes BsAII-S1-93 e BsAII-S2-26 foram comparadas à enzima nativa em termos cinéticos, o que permite fazer uma avaliação do efeito das mutações na velocidade de catálise do substrato. A velocidade inicial de catálise, medida nos primeiros 30 min de reação

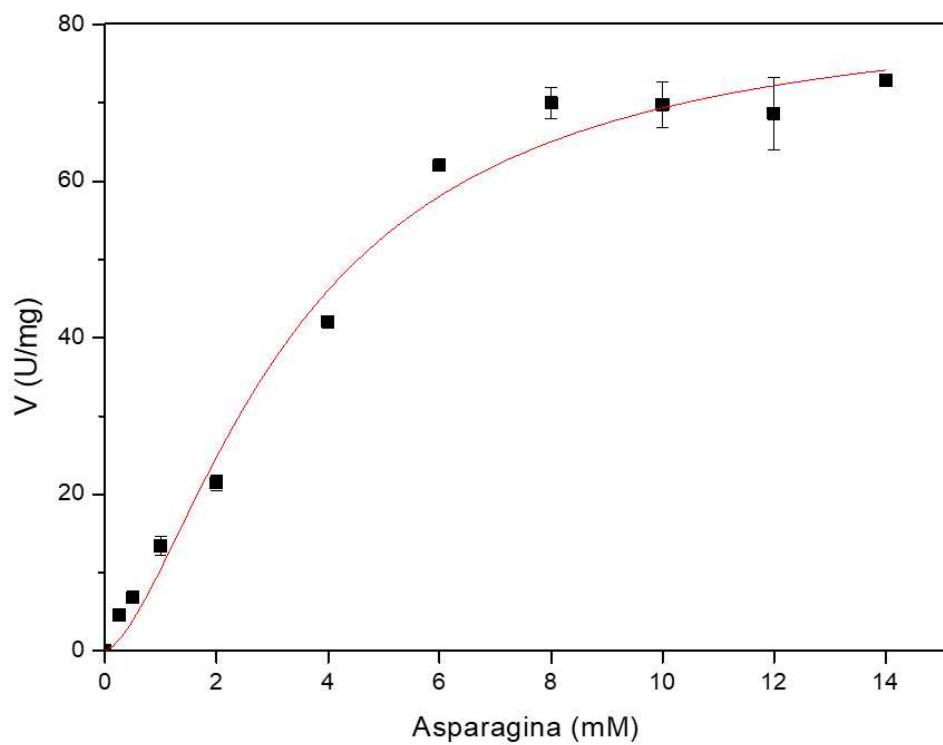
enzimática, foi obtida para as três enzimas em diferentes concentrações de substrato, até atingir um platô. Os resultados foram utilizados para a obtenção do K_M e da Velocidade inicial máxima ($V_{MÁX}$) através da construção da curva de Michaelis-Menten no software OriginPro® 8.5. As curvas estão mostradas nas Figuras 28, 29 e 30, e os valores de K_M e $V_{MÁX}$ obtidos estão sumarizados na Tabela 6.

Figura 28 – Curvas de cinética enzimática da BsAII nativa



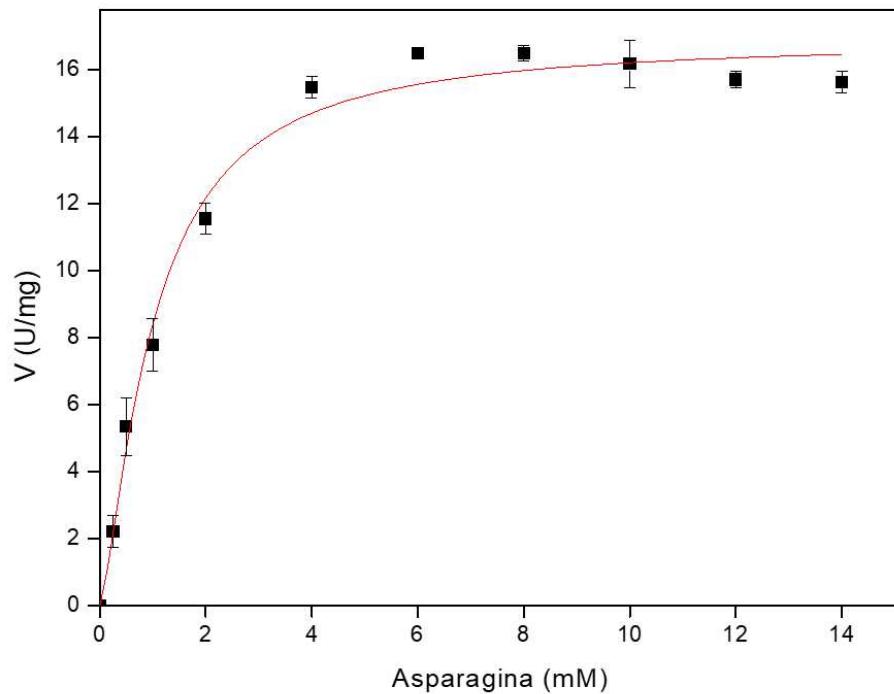
Fonte: Elaborado pelo autor. Avaliação da velocidade inicial de catálise da BsAII nativa diante da mudança de concentração do substrato Asn. Análise feita no software OriginPro® 8.5. O ensaio foi conduzido em Tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM, na temperatura de 37 °C.

Figura 29 – Curvas de cinética enzimática da variante BsAII-S2-Mut26



Fonte: Elaborado pelo autor. Avaliação da velocidade inicial de catálise da variante BsAII-S2-Mut26 diante da mudança de concentração do substrato Asn. Análise feita no software OriginPro® 8.5. O ensaio foi conduzido em Tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM, na temperatura de 37 °C.

Figura 30 – Curvas de cinética enzimática da variante BsAII-S1-Mut93



Fonte: Elaborado pelo autor. Avaliação da velocidade inicial de catálise da variante BsAII-S2-Mut26 diante da mudança de concentração do substrato Asn. Análise feita no software OriginPro® 8.5. O ensaio foi conduzido em

Tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM, na temperatura de 37 °C.

Tabela 6 – Constantes cinéticas da BsAII nativa e dos mutantes BsAII-S1-Mut93 e BsAII-S2-Mut26

Enzima	K_M (mM)	$V_{MÁX}$ (U/mg)
BsAII Nativa	$3,64 \pm 0,52$	$81,23 \pm 6,62$
BsAII – S1-Mut93	$1,00 \pm 0,11$	$16,90 \pm 0,60$
BsAII – S2-Mut26	$3,44 \pm 0,58$	$82,54 \pm 7,25$

Fonte: o autor. Dados obtidos através da análise das curvas de Michaelis-Menten, gerados pelo software OriginPro® 8.5. Os ensaios foram conduzidos na temperatura de 37 °C, em solução Tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM, pH 8,0. K_M é a constante de Michaelis-Menten; $V_{MÁX}$ é a velocidade inicial máxima de catálise enzimática.

Observando a Tabela 6, nota-se que a $V_{MÁX}$ de BsAII nativa e BsAII-S2-Mut26 foram bem similares, mostrando que as mutações praticamente não influenciaram nos parâmetros cinéticos desse mutante. Quanto ao K_M , houve uma redução considerável na BsAII-S1-93 em relação a enzima nativa, indicando que o mutante possui maior afinidade pelo substrato, sendo algo bem interessante em aplicações terapêuticas. Entretanto a $V_{MÁX}$ reduziu drasticamente, mostrando a influência deletéria das mutações na atividade da enzima.

8 CONCLUSÃO

O uso de técnicas de evolução dirigida se mostrou eficaz para o desenvolvimento de mutantes viáveis de BsAII. A produção de L-ASNases de *Bacillus subtilis* em meio sólido e líquido foi verificada com sucesso, graças a utilização de uma sequência sinal para exportação da enzima expressa para o meio extracelular. Isso possibilitou estabelecer métodos de *screening* iniciais que permitiram rastrear e selecionar mutantes com atividade enzimática diretamente em placas de Petri. O método de *screening* utilizando reagente de Nessler demonstrou-se mais eficiente no rastreio de mutantes viáveis de BsAII em comparação aquele que faz uso do corante azul de bromotimol.

A variante BsAII-S1-Mut93, embora com atividade asparaginásica menor, exibiu uma afinidade consideravelmente maior pelo substrato L-asparagina em comparação a enzima nativa, uma característica de extrema importância para a utilização de L-ASNase no tratamento de LLA. Estudos adicionais são necessários para explorar o efeito de suas mutações na afinidade da enzima pelo seu substrato.

Este trabalho mostra que as abordagens de evolução dirigida de proteínas têm muito potencial para gerar enzimas com maior eficiência catalítica e que a L-asparaginase II de *Bacillus subtilis* ainda têm muito a ser explorada como potencial agente terapêutico.

9 PERSPECTIVAS

A pequena quantidade de mutantes obtidos no processo de rastreamento e seleção indica a necessidade de aperfeiçoamento dos métodos de *screening* aplicados neste projeto para selecionar mutantes com melhores propriedades catalíticas. Os experimentos devem seguir com foco em encontrar mutantes com elevada atividade asparaginásica, maior afinidade pelo substrato e menor atividade glutaminásica, visando a completa caracterização dos mutantes selecionados, a fim de atingir um patamar em que seja possível afirmar com segurança a viabilidade do método de *screening*, uma vez que é o principal gargalo do processo.

Estudos futuros ainda devem ser realizados para investigar com mais afinco os efeitos das mutações selecionadas na atividade e afinidade da BsAII e assim identificar as posições mais relevantes na sequência do gene *ansZ* que possam ser exploradas em novos experimentos de mutagênese. Uma vez que novos mutantes com propriedades melhoradas tenham sido selecionados o foco será a realização de testes *in vitro* com linhagens leucêmicas e ensaios *in vivo* para atestar a eficácia das variantes de BsAII no tratamento de LLA.

REFERÊNCIAS

- AMYLON, M. D. 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.
- ANBU, P. et al. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-3, 2017.
- ANISHKIN, A. et al. Catalytic role of the substrate defines specificity of therapeutic L-asparaginase. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 17, p. 2867-2885, 2015.
- ARNOLD, F. H. Directed evolution: creating biocatalysts for the future. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 23, p. 5091-5102, 1996.
- ARNOLD, F. H. Directed evolution: bringing new chemistry to life. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 57, n. 16, p. 4143-4148, 2018.
- AVRAMIS, V. I. et al. Immunogenicity of native or pegylated *E. coli* and *Erwinia* asparaginases assessed by ELISA and surface plasmon resonance (SPR-Biacore) assays of IgG antibodies (Ab) in sera from patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Anticancer Research**, v. 29, p. 299-302, 2009.
- AVRAMIS, V. I.; TIWARI, N. P. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, p. 241-254, 2006.
- AVRAMIS, V. I. et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 1986-1994, 2002.
- AVRAMIS, V. I. et al. Pharmacodynamic (PD) analyses of asparagine (Asn) deamination and Asn input (Imax) in serum of pediatric patients with standard risk acute lymphoblastic leukemia (SR ALL) receiving native or pegylated *E. coli* asparaginases (ASNase) (CCG-1962). **Blood**, v. 104, n. 11, p. 2082, 2004.
- BATOOL, T. et al. A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 900-923, 2016.
- BECKMAN, R. A.; MILDVAN, A. S.; LOEB, L. A. On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. **Biochemistry**, v. 24, p. 5810-5817, 1985.
- BERGESON, A. R.; ALPER, H. S. Advancing sustainable biotechnology through protein engineering. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 49, p. 955-968, 2024.
- BEZERRA, M. R. L. **Evolução dirigida da região variável do anticorpo monoclonal rituximabe:** construção de uma biblioteca para seleção de moléculas anti-CD20 com alta

afinidade via phage display. 2019. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

BLOOM, J. D.; ARNOLD, F. H. In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 106, p. 9995-10000, 2009.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects: I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, p. 99-120, 1963.

BRUMANO, L. P. et al. Development of L-asparaginase biobetters: current research status and review of the desirable quality profiles. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2019.

CACHUMBA, J. J. M. et al. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 77-85, 2016.

CADWELL, R. C.; JOYCE, G. F. Randomization of genes by PCR mutagenesis. **Genome Research**, v. 2, n. 1, p. 28-33, 1992.

CAETANO, L. F. **Produção e caracterização preliminar de variantes de L-asparaginase II de *Escherichia coli* de menor potencial imunogênico: combinação de estudos *in silico* e *in vitro***. 2020. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

CASTRO, D. et al. L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 4515-4534, 2021.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 438-443, 2003.

CLEMENTI, A. La désamidation enzymatique de L'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physiologique de sa présence dans l'organisme. **Archives Internationales de Physiologie**, v. 19, p. 369-398, 1922.

COBB, R. E.; CHAO, R.; ZHAO, H. Directed evolution: past, present, and future. **AICHE Journal**, v. 59, n. 5, p. 1432-1440, 2013.

DOUER, D. et al. Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction in adults aged 55 years or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 109, p. 2744-2750, 2007.

DOUER, D. et al. Optimizing use of L-asparaginase-based treatment of adults with acute lymphoblastic leukemia. **Blood Reviews**, v. 53, 2022.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 98, p. 493-501, 1977.

- DUNN, I. S. Phage display of proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 547-553, 1996.
- ECKERT, K. A.; KUNKEL, T. A. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. **Genome Research**, v. 1, n. 1, p. 17-24, 1991.
- EGLER, R. A.; AHUJA, S. P.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 7, p. 62-71, 2016.
- FREITAS, M. M. de et al. Interferences that impact measuring optimal L-asparaginase activity and consequent errors interpreting these data. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 13, p. 5161-5166, 2019.
- GOPINATH, Subash C. B. et al. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 154549, 2013
- GROSSOWICZ, N. et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 187, n. 1, p. 111-125, 1950.
- GUIMARÃES, A. V. F.; FROTA, N. F.; LOURENZONI, M. R. Molecular dynamics simulations of human L-asparaginase: insights into structural determinants of enzymatic activity. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 109, 2021.
- GUIMARÃES, D. V. *Estudo comparativo da L-asparaginase de *E. coli* e *Phaseolus vulgaris* utilizando Dinâmica Molecular*. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 23-26, 1997.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HE, Y. C. et al. A high-throughput screening strategy for nitrile-hydrolyzing enzymes based on ferric hydroxamate spectrophotometry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 817-823, 2011.
- HUSAIN, I. et al. Purification and characterization of glutaminase free asparaginase from *Pseudomonas otitidis*: induce apoptosis in human leukemia MOLT-4 cells. **Biochimie**, v. 121, p. 38-51, 2016.
- ILLANES, A. et al. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 48-57, 2012.
- IMADA, A. et al. Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, p. 85-99, 1973.

- IZADPANAH, F. et al. Marine microbial L-asparaginase: biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. **Microbiological Research**, v. 208, p. 99-112, 2018.
- JIA, R. et al. Microbial L-asparaginase for application in acrylamide mitigation from food: current research status and future perspectives. **Microorganisms**, v. 9, p. 1-21, 2021.
- JOO, H. et al. A high-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases. **Chemistry and Biology**, v. 6, p. 699-706, 1999.
- KATZ, A. J. et al. Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden. **Cancer Causes and Control**, v. 26, n. 11, p. 1627-1642, 2015.
- KEATING, M. J. et al. L-asparaginase and PEG asparaginase - past, present, and future. **Leukemia and Lymphoma**, v. 10, p. 153-157, 1993.
- KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 98, p. 565-583, 1953.
- KILLANDER, D. et al. Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. **Cancer**, v. 37, p. 220-228, 1976.
- KOTZIA, G. A.; LAPPA, K.; LABROU, N. E. Tailoring structure-function properties of L-asparaginase: engineering resistance to trypsin cleavage. **Biochemical Journal**, v. 404, n. 2, p. 337-343, 2007.
- KROLL, A. et al. Turnover number predictions for kinetically uncharacterized enzymes using machine and deep learning. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2023.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LANVERS, C. et al. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L L-asparaginase in human serum. **Analytical Biochemistry**, v. 309, p. 117-126, 2002.
- LEE, S.-M.; WROBLE, M. H.; ROSS, J. T. L-asparaginase from *Erwinia carotovora*: an improved recovery and purification process using affinity chromatography. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, p. 1-11, 1989.
- LI, S. et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, 2012.
- LIMA, J. Y. de et al. Dissecting dual specificity: identifying key residues in L-asparaginase for enhanced acute lymphoid leukemia therapy and reduced adverse effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, 2024.
- LOMELINO, C. L. et al. Asparagine synthetase: function, structure, and role in disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, p. 19952-19958, 2017.

LOPES, A. M. et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, p. 82-99, 2017.

LOURENZONI, M. R. et al. **Método de obtenção do vetor de expressão, cassete de expressão, vetor de expressão e sistema de expressão para a produção constitutiva e secreção de proteínas heterólogas**. BR 102014017026-0 A2. Concessão: 2016.

LUBKOWSKI, J. et al. Mechanism of catalysis by L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 59, n. 20, p. 1927-1945, 2020.

LUTZ, S. Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 734-743, 2010.

MACK, M. et al. A high-throughput microtiter plate-based screening method for the detection of full-length recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 61, n. 1, p. 92-98, 2008.

MAGRI, A. et al. A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods: colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 27, p. 6985-6990, 2018.

MAHAJAN, R. V. et al. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, n. 2, p. 122-126, abr. 2013.

MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 105, p. 450-453, 1964.

MCCULLUM, E. O. et al. Random mutagenesis by error-prone PCR. **Methods in Molecular Biology**, v. 634, p. 103-109, 2010.

MCLURE, R. J.; RADFORD, S. E.; BROCKWELL, D. J. High-throughput directed evolution: a golden era for protein science. **Trends in Chemistry**, v. 4, p. 378-391, 2022.

MIHOOLIYA, K. N. et al. A new pH indicator dye-based method for rapid and efficient screening of L-asparaginase producing microorganisms. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 107, p. 72-81, 2017.

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

MORENO, A. D. et al. Laccases as versatile enzymes: from industrial uses to novel applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, p. 481-494, 2020.

MOTTA, J. F. G. et al. Use of enzymes in the food industry: a review. **Food Science and Technology (Brazil)**. Sociedade Brasileira de Ciéncia e Tecnologia de Alimentos, SBCTA, 2023.

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

NAIR, A. M.; MARY, A.; YADAV, S. A meta-review on principles of recombinant DNA technology. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 4, p. 902-926, 2021.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2022.

NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. **Biomolecules**, v. 3, p. 597-611, 2013.

ONISHI, Y. et al. Effective treatment for suppression of acrylamide formation in fried potato chips using L-asparaginase from *Bacillus subtilis*. **Biotech**, v. 5, n. 5, p. 783-789, 22 out. 2015.

ORIOL, A. et al. Outcome after relapse of acute lymphoblastic leukemia in adult patients included in four consecutive risk-adapted trials by the PETHEMA study group. **Haematologica**, v. 95, n. 4, p. 589-596, 2010.

PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 849-858, 2010.

PANOSYAN, E. H. et al. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 26, p. 217-226, 2004.

PAUL, S.; KANTARJIAN, H.; JABBOUR, E. J. Adult acute lymphoblastic leukemia. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 91, p. 1645-1666, 2016.

PEDROSA, F.; LINS, M. Leucemia linfoide aguda: uma doença curável. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 2, p. 63-68, 2002.

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

RILEY, R. S.; MASSEY, D.; JACKSON-COOK, C.; IDOWU, M.; ROMAGNOLI, G. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 16, n. 2, p. 245-299, 2002.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

ROWE, J. M. et al. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3760-3767, 2005.

SAVITRI; ASTHANA, N.; AZMI, W. Microbial L-asparaginase: a potent antitumor enzyme. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 184-194, 2003.

- SHARMA, A. et al. Enzyme engineering: current trends and future perspectives. **Food Reviews International**, v. 37, p. 121-154, 2021.
- SHIFRIN, S.; PARROTT, C. L.; LUBORSKY, S. W. Substrate binding and intersubunit interactions in L-asparaginase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 5, p. 1335-1340, 1974.
- SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 1-10, 2016.
- SIDHU, S. S. et al. Phage display for selection of novel binding peptides. **Methods in Enzymology**, p. 333-363, 2000.
- SIMAS, R. G. et al. An improved method for simple and accurate colorimetric determination of L-asparaginase enzyme activity using Nessler's reagent. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 1326-1332, 2021.
- SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.
- SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage display. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 391-410, 1997.
- SONG, Z. et al. Rational design of enzyme activity and enantioselectivity. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023.
- STEMMER, W. P. C. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. **Genetics**, v. 91, p. 10747-10751, 1994.
- STIMPLE, S. D.; SMITH, M. D.; TESSIER, P. M. Directed evolution methods for overcoming trade-offs between protein activity and stability. **AIChE Journal**, v. 66, n. 3, 2020.
- SWAIN, A. L. et al. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy (amidohydrolase/leukemia/active site/aspartate). **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 90, p. 1474-1478, 1993.
- TRONO, D. Recombinant enzymes in the food and pharmaceutical industries. In: PANDEY, A. (Ed.). **Advances in Enzyme Technology**. Amsterdam: Elsevier, 2019, p. 349-387.
- UENO, T. et al. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. **Leukemia**, v. 11, p. 1858-1861, 1997.
- ULU, A.; ATES, B. Immobilization of L-asparaginase on carrier materials: a comprehensive review. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1598-1610, 2017.
- VALA, A. K. et al. Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 41-46, 2018.

VAN DER SLUIS, I. M. et al. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. **Haematologica**, v. 101, n. 3, p. 279-285, 2016.

WARTENBERG, D.; GROVES, F. D.; ADELMAN, A. S. Chapter 5 · Acute lymphoblastic leukemia: epidemiology and etiology. In: **Hematologic Malignancies**, p. 77-93, 2008.

WATT, A. P. et al. Higher throughput bioanalysis by automation of a protein precipitation assay using a 96-well format with detection by LC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 5, p. 979-984, 2000.

WERKMAN, J. R.; PATTANAIK, S.; YUAN, L. Directed evolution through DNA shuffling for the improvement and understanding of genes and promoters. **Methods in Molecular Biology**, v. 754, p. 325-342, 2011.

WETZLER, M. et al. Effective asparagine depletion with pegylated asparaginase results in improved outcomes in adult acute lymphoblastic leukemia: Cancer and leukemia group B study 9511. **Blood**, v. 109, p. 4164-4167, 2007.

WILSON, D. S.; KEEFE, A. D. Random mutagenesis by PCR. **Current Protocols in Molecular Biology**, 2001.

XIAO, H.; BAO, Z.; ZHAO, H. High throughput screening and selection methods for directed enzyme evolution. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 16, p. 4011-4020, 2015.

YANG, H. et al. Rational design to improve protein thermostability: recent advances and prospects. **Chemical Bio Engineering Reviews**, Wiley-Blackwell, 2015.

YAO, M. et al. Structure of the type I L-asparaginase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* at 2.16 Å resolution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 61, n. 3, p. 294-301, 2005.

ZENATTI, P. P. et al. Low bioavailability and high immunogenicity of a new brand of *E. coli* L-asparaginase with active host contaminating proteins. **eBioMedicine**, v. 30, p. 158-166, 2018.

APÊNDICE A – PROTOCOLO MODIFICADO DE PURIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO KIT

PCR purification Kit, DNA Cleanup® - Cellco

1. Recortar as bandas referentes ao vetor linearizado e adiciona-las em tubos de 1,5mL. Em caso de soluções, utilizar pelo menos 100µL de solução (adicionar água ultrapura caso tenha menos de 100µL).
2. Adicionar 5 µL de *Binding Buffer* para cada 1 mg de fragmento de gel ou para cada 1µL de solução de produto de PCR. Misturar em vórtex e incubar a 50-65°C até o gel dissolver completamente.
3. Inserir a minicoluna SV em um tubo de coleta.
4. Adicionar 100 µL de *Activation Buffer* e centrifugar a 10.000 x g por 30 s.
5. Transferir a mistura do passo 2 para o arranjo da minicoluna. Incubar em temperatura ambiente por 1 min.
6. Centrifugar a 10.000 x g por 30 s, descartar o líquido eluído.
7. Adicionar 700µL do *Washing Buffer* (contendo etanol) no arranjo da minicoluna.
8. Centrifugar a 10.000 x g por 30 s. Descartar o eluído e reinserir a coluna no tubo de coleta.
9. Repetir o passo anterior. Centrifugar novamente a 10.000 x g por 2 min.
10. Deixar o arranjo de coluna em temperatura ambiente para evaporação de etanol residual.
11. Cuidadosamente, transferir a minicoluna para um microtubo estéril de 1,5mL.
12. Realizar duas eluições de 25 µL de água ultrapura cada, centrifugando a 16.000 x g por 1min em cada eluição. OBS: utilizar água pré-aquecida a 65 °C e deixar a água incubando com a coluna em temperatura ambiente por 1min antes de centrifugar.
13. Quantificar o DNA e armazenar em -20 °C.

APÊNDICE B – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL UTILIZANDO KIT

PureYield™ Plasmid Miniprep System – Promega

1. Centrifugar 1,5mL da cultura de bactérias por 30 s a 16.000 x g e descartar o sobrenadante
2. Repetir o passo 1 para processar volumes maiores de cultura.
3. Adicionar 600 µL de água mili-q ao pellet de células e ressuscender completamente.
4. Adicionar 100 µL de *Cell Lysis Buffer* e misturar por inversão os microtubos 6 vezes. Obs: a solução deve mudar de opaco para azul claro, indicando lise completa. Prosseguir para o próximo passo em até 2 min
5. Adicionar 350 µL (4-8 °C) a solução de neutralização e misturar por inversão. As amostras ficarão amarelas quando a neutralização estiver completa e um precipitado de amarelo será formado.
6. Centrifugar a 16.000 x g por 3 min e transferir o sobrenadante (~900 µL) para minicolunas *PureYield™* sem perturbar os restos celulares.
7. Colocar a minicoluna em tubos de coleta e centrifugar a 16.000 x g por 15 s e descartar o líquido eluído.
8. Adicionar 200 µL de *Endotoxin Removal Wash* na minicoluna e centrifugar a 16.000 x g por 15 s
9. Adicionar 400 µL de *Column Wash Solution* na minicoluna e centrifugar a 16.000 x g por 30 s
10. Cuidadosamente, transferir a minicoluna para um microtubo estéril de 1,5mL.
11. Realizar duas eluições de 25 µL de água ultrapura cada, centrifugando a 16.000 x g por 1 min em cada eluição. OBS: utilizar água pré-aquecida a 65 °C e deixar a água incubando com a coluna em temperatura ambiente por 1min antes de centrifugar.
12. Quantificar o DNA e armazenar em -20 °C.

APÊNDICE C – REAÇÕES ENZIMÁTICAS

1. DIGESTÃO DE pET28a E RPC (VETOR DERIVADO DE PT7T3-18U)

5U de NheI

5U de BamHI

3µL de Tampão Multicore 10X

3µL de solução aLBumina 10X

~1µg de amostra de DNA (RPC ou pET28a)

2. REAÇÃO COM T4 LIGASE

Para ligação dos vetores pET28a e RPC com produtos *epPCR* foi utilizada a fórmula:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)} \times \text{razão (inserto:vetor)}}{\text{tamanho do vetor}}$$

Foram utilizados a 100ng do vetor e proporção 1:10 (inserto:vetor). Portanto, a reação de 20µL, foi composta de:

- a. Para a ligação com vetor pET28a

Vetor pET28a digerido = 100 ng

Inserto *epPCR* digerido = 196 ng

Tampão T4 Ligase 10X = 2µL

T4 Ligase = 1µL

- b. Para a ligação com vetor RPC:

Vetor pET28a digerido = 100 ng

Inserto *epPCR* digerido = 277 ng

Tampão T4 Ligase 10X = 2µL

T4 Ligase = 1µL

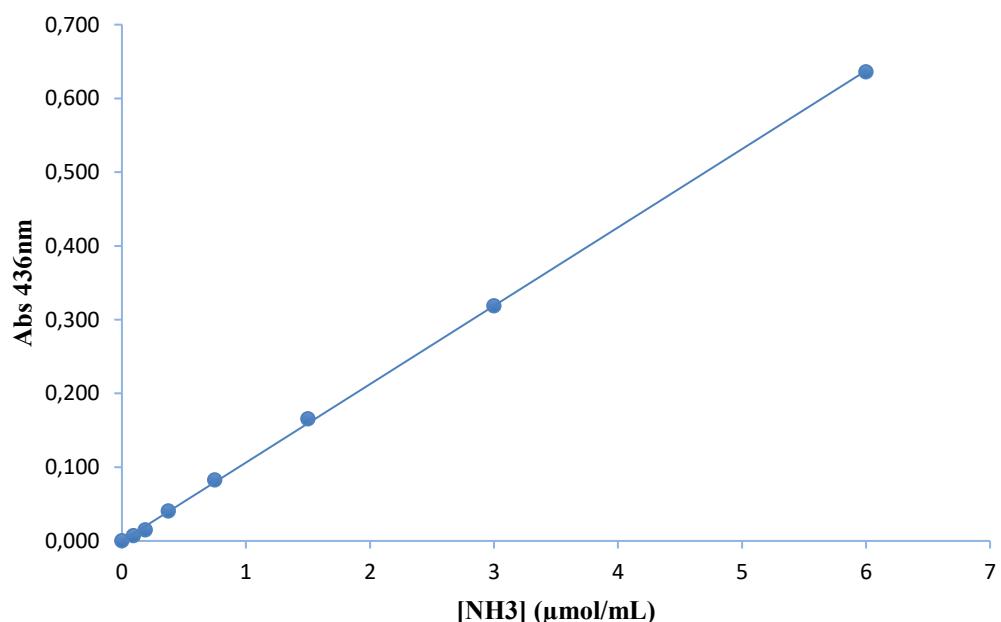
APÊNDICE D – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AMÔNIA

Curva de calibração da amônia para o método colorimétrico de Nessler

Concentração de amônia ($\mu\text{mol/mL}$)	Absorbância
0	0
0,094	0,007
0,188	0,015
0,375	0,041
0,750	0,083
1,500	0,166
3,000	0,319
6,000	0,636

Fonte: elaborada pelo autor.

Curva de calibração da amônia para o método colorimétrico de Nessler



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para obtenção da concentração de amônia, as absorbâncias são aplicadas de acordo com a seguinte equação:

$$[\text{NH3}] (\mu\text{mol/mL}) = \frac{\text{Abs} - 0,0009}{0,1061}, \text{ onde Abs é o valor de absorbância a } 436\text{m.}$$