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

# Caracterização bioquímica e avaliação citotóxica de isoformas mutantes de L-asparaginase II de *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*)

Iris Munhoz Costa

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientadora: Profa. Dra. Gisele Monteiro

São Paulo
2022

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

# Caracterização bioquímica e avaliação citotóxica de isoformas mutantes de L-asparaginase II de *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*)

Iris Munhoz Costa

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientadora: Profa. Dra. Gisele Monteiro

São Paulo
2022

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

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

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

C837c

Costa, Iris Munhoz
Caracterização bioquímica e avaliação citotóxica de isoformas mutantes de L-asparaginase II de Dickeya chrysanthemi (Erwinia chrysanthemi) / Iris Munhoz Costa. - São Paulo, 2022.
137 p.

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

1. L-asparaginase. 2. Erwinia chrysanthemi. 3. engenharia de proteína. 4. edição genica. 5. catepsina B. I. T. II. Monteiro, Gisele, orientador.

Iris Munhoz Costa

Caracterização bioquímica e avaliação citotóxica de isoformas mutantes de L-asparaginase II de *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*)

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título DOUTOR

Profa. Dra. Gisele Monteiro
orientadora/presidente

_____
1° examinador

_____
2° examinador

_____
3° examinador

_____
4° examinador

São Paulo, _____de _____de 2022.

# AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Ao instituto de pesquisa *Cold Spring Harbor Laboratory.*

Á Professora Dra. Gisele Monteiro, minha "mãe de ciência", pela oportunidade de ingressar na carreira científica, pelos nove anos de orientação, desde a iniciação científica, mestrado e doutorado. Pela paciência, ensinamentos, confiança e amizade ao longo desses anos.

À Professora Dra. Camila Oresco dos Santos da *Cold Spring Harbor Laboratory* por me receber tão bem no seu grupo de pesquisa, pela oportunidade e ensinamentos. Aos seus alunos e pesquisadores que me ajudaram muito dentro e fora do laboratório.

Aos Professores Dr. Christopher Vakoc e Dr. Hiro Furukawa da *Cold Spring Harbor Laboratory* pela concessão das células humanas e utilização do equipamento para purificação das proteínas, respectivamente.

Aos alunos e ex-alunos do laboratório LABIMBIM, que me auxiliaram e inspiraram, pelas conversas e trocas de experiências profissionais e pessoais. Em especial ao Dr. Tales, Guilherme, Henrique, Gabriela, Carolina, Massiel e Grace.

À Dra. Débora Custódio Moura, pelos clones produzidos utilizados nesse trabalho, e pela sua amizade e parceria dentro e fora do laboratório.

À Dra. Marcela Pimenta da Fonte, que se tornou uma grande amiga dentro e fora do laboratório e que me ajudou muito durante o doutorado.

Ao Dr. Brian Éffer, que iniciou os estudos com CRISPR/cas9.

Aos Professores Dr. Adalberto Pessoa Júnior e Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui pela parceria no projeto temático e utilização de seus equipamentos e reagentes.

Aos alunos do Prof. Dr. Adalberto e Profa. Dra. Carlota pelas trocas de experiências, aprendizado, conversas e muitas risadas.

Aos técnicos Larissa Bentin e Gledson pela ajuda, amizade, conversas, desabafos e risadas.

Ao Professor Dr. Luís Eduardo Soares Netto e ao técnico Tiago Alegria, do Laboratório de Proteínas e Biologia Redox do Instituto de Biociências – USP, pela utilização da sua estrutura e auxilio na realização de experimentos.

À minha família, em especial a minha mãe Claudia, ao meu irmão Danilo e aos meus avós Maria e Alcides por todo apoio, sem eles não seria possível chegar até aqui.

Ao meu marido Anderson pela paciência, compreensão, incentivo e força. À minha filha Heloísa, que chegou no final do doutorado, mas já me ensinou muito em pouco tempo e hoje é minha maior motivação.

Á Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto temático 2013/08617-7, do projeto de doutorado 2016/25896-5 e do projeto BEPE 2019/09953-3.

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

# RESUMO

COSTA, I. M. **Caracterização bioquímica e avaliação citotóxica de isoformas mutantes de L-asparaginase II de *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*)**. 2022. 137f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a neoplasia mais frequente em crianças e adolescentes. Esse tumor tem como característica a auxotrofia para o aminoácido L-asparagina, o que permite que o tratamento da doença seja feito com a L-asparaginase (ASNase), enzima obtida a partir das bactérias *Escherichia coli* e *Dickeya chrysanthemi* (também denominada *Erwinia chrysanthemi*). A ASNase hidrolisa a L-asparagina, e L-glutamina em menor quantidade, impedindo que as células tumorais obtenham L-asparagina da circulação sanguínea para síntese de proteínas, levando a morte celular por apoptose. No entanto, as formulações disponíveis para terapêutica estão associadas a um alto índice de efeitos adversos, como toxicidade e a resistência ao medicamento causada pela produção de anticorpos e pela ação de proteases. Desta maneira, o desenvolvimento de proteoformas mutantes a partir das enzimas já comercializadas e o estudo da ação de proteases durante o tratamento podem contribuir para o desenvolvimento de uma enzima com menos efeitos adversos. Por isso, o nosso grupo de pesquisa criou uma biblioteca de mutantes utilizando a ASNase de *D. chrysanthemi*, por PCR propenso a erro, e de dez clones mutantes estudados uma proteoforma dupla mutante (DM) apresentou melhores parâmetros cinéticos do que a enzima selvagem (WT), sendo altamente ativa em condições fisiológicas testadas *in vitro*. Além disso, a enzima DM apresentou um menor reconhecimento por anticorpos anti-asparaginase e o mesmo potencial citotóxico do que a enzima WT, podendo ocasionar menos efeitos adversos. Além disso, criamos as células de LLA REH *knockout* para protease catepsina B (CTSB) por CRISPR/cas9, e avaliamos a viabilidade celular após o tratamento com as ASNases WT de *E. coli* e *D. chrysanthemi*, e com a enzima DM. Os nossos resultados sugerem que a expressão de CTSB pelas células REH é muito baixa e não alteram a resposta ao tratamento com ASNases quando avaliadas *in vitro*.

**Palavras-chave:** L-asparaginase; Leucemia linfoblástica aguda; *Erwinia chrysanthemi*; engenharia de proteína; edição genica; CRISPR/cas9; Catepsina B.

# ABSTRACT

COSTA, I. M. **Biochemical characterization and cytotoxic evaluation of mutant isoforms of L-asparaginase II from *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*)**. 2022. 137f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent neoplasm in children and adolescents. This tumor is characterized by auxotrophy for the amino acid L-asparagine, which allows the treatment of the disease to be carried out with L-asparaginase (ASNase), an enzyme obtained from the bacteria *Escherichia coli* and *Dickeya chrysanthemi* (also called *Erwinia chrysanthemi*). ASNase hydrolyzes L-asparagine, and L-glutamine to a lesser extent, preventing tumor cells from obtaining L-asparagine from the bloodstream for protein synthesis, leading to cell death by apoptosis. However, the formulations available for therapy are associated with a high rate of adverse effects, such as toxicity and drug resistance caused by the production of antibodies and the action of proteases. In this way, the development of mutant proteoforms from enzymes already commercialized and the study of the action of proteases during treatment can contribute to the development of an enzyme with fewer adverse effects. Therefore, our research group created a library of mutants using the *D. chrysanthemi* ASNase, by error prone PCR, and from ten mutant clones studied a double mutant proteoform (DM) showed better kinetic parameters than the wild-type enzyme (WT), being highly active under physiological conditions tested *in vitro*. In addition, the DM enzyme showed less recognition by anti-asparaginase antibodies and the same cytotoxic potential as the WT enzyme, which may cause fewer adverse effects. In addition, we created REH ALL cells knockout for cathepsin B (CTSB) protease by CRISPR/cas9, and evaluated cell viability after treatment with *E. coli* and *D. chrysanthemi* WT ASNases, and with the DM enzyme. Our results suggest that the expression of CTSB by REH cells is very low and does not alter the response to treatment with ASNases when evaluated *in vitro*.

**Keywords:** L-asparaginase; Acute lymphoblastic leukemia; *Erwinia chrysanthemi*; protein engineering; genetic editing; CRISPR/cas9; Cathepsin B.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hematopoese.....17
Figura 1.1 - Representação da estrutura da proteína ASNase de *D. chrysanthemi*.....33
Figura 1.2 - Construção do pET-15b + *ansB* de *D. chrysanthemi*.....35
Figura 1.3 - Confirmação da obtenção dos plasmídeos e confirmação da presença de inserto por gel de agarose 1%.....48
Figura 1.4 - Gel SDS-PAGE 14% para confirmação da purificação das dez proteoformas mutantes (1 a 10) e selvagem (WT) da enzima ASNase de *D. chrysanthemi*.....49
Figura 1.5 - Identificação dos resíduos mutados na ASNase de *D. chrysanthemi* proteoforma 6.....52
Figura 1.6 - Avaliação do grau de purificação e conformação das proteínas.....53
Figura 1.7 - Análise do grau de oligomerização da enzima DM em comparação com a WT por espalhamento dinâmico de luz (DLS).....54
Figura 1.8 – Espectro do dicroísmo circular das proteoformas WT e DM e quadro relacionando a porcentagem das estruturas secundárias.....55
Figura 1.9 – Determinação da atividade específica e parâmetros cinéticos para L-asparagina da proteoforma DM e enzima selvagem (WT).....56
Figura 1.10 – Determinação da atividade específica e parâmetros cinéticos para L-glutamina da proteoforma DM e enzima selvagem (WT).....58
Figura 1.11 - Atividade específica das enzimas WT e DM utilizando como substrato a L-glutamina nas concentrações de 0,5 e 2,0 mM.....59
Figura 1.12 – Análise da atividade enzimática frente a variação de pH, temperatura e cofatores.....61
Figura 1.13 - Efeito do soro humano na atividade enzimática das proteoformas WT e DM.....62
Figura 1.14 - Predição de epítopos antigênicos.....64
Figura 1.15 - Ensaio de ELISA para determinação de reconhecimento de anticorpo anti-ASNase de *D. chrysanthemi*.....65
Figura 1.16 - Avaliação de resistência as proteases catepsina B (CTSB) e a asparagina endopeptidase (AEP).....65
Figura 1.17 - Ensaio de citotoxicidade das enzimas WT e DM usando as linhagens de LLA MOLT-4 e REH cultivadas *in vitro*.....67

Figura 2.1 - Validação das construções LGR + sgRNA-1 a 5 para o *knockout* do gene *CTSB*.....97
Figura 2.2 - Produção de partículas de lentivírus por transfecção usando as células HEK293T.....98
Figura 2.3 - Imagem representativa da infecção das células REHcas9 usando partículas de lentivírus sgRNA-Rosa26.....99
Figura 2.4 - Taxa de infecção das células REHcas9 monitoradas ao longo dos dias.....100
Figura 2.5 - Confirmação da edição do gene *CTSB* por qPCR.....101
Figura 2.6 - Infecção de células HEPG2cas9 usando partículas de lentivírus para avaliar a eficiência de edição dos oligos sgRNA1-5.....103
Figura 2.7 - *Western blotting* usando REHcas9 + sgRNAs e HEPG2cas9 + sgRNAs.....104
Figura 2.8 - Ensaio de atividade da catepsina B das células não infectadas e infectadas com sgRNAs (1 a 5) e Rosa26.....105
Figura 2.9 – Análise da edição do gene *CTSB* em células REHcas9 por sequenciamento.....107
Figura 2.10 – Sequência da proteína CTSB humana (código Uniprot: P07858).....108
Figura 2.11 - Confirmação da purificação das enzimas ErA_WT, ErA_DM e EcA_WT por eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%.....108
Figura 2.12 - Atividade específica para as enzimas ErA_WT, ErA_DM e EcA_WT determinada com reagente de Nessler.....109
Figura 2.13 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* por fluorescência com *AlamarBlue*.....110
Figura 2.14 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* por colorimetria com MTT.....112

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1- Proteoformas de ASNase mutantes selecionadas para caracterização.....36
Tabela 1.2 - Atividade específica das proteoformas mutantes de ASNase.....50
Tabela 1.3 - Análise de DLS das enzimas WT e DM.....54
Tabela 1.4 - Parâmetros cinéticos das enzimas ASNase WT e DM para L-asparagina.....57
Tabela 1.5 - Parâmetros cinéticos das enzimas WT e DM para L-glutamina.....58
Tabela 1.6 - Valores de $IC_{50}$ determinado a partir do ensaio de citotoxicidade.....67
Tabela 2.1 - Oligos desenhados codificando sgRNA para o gene *CTSB*.....84

Tabela 2.2 - Iniciadores para qPCR: as sequências flanqueiam a região de edição do gene *CTSB*.....90
Tabela 2.3 - Análise das edições na sequência de DNA e da proteína.....107
Tabela 2.4 - Valores de $IC_{50}$ (U/mL) obtidos pelo ensaio de citotoxicidade.....111
Tabela 2.5 - Valores de $IC_{50}$ (U/mL) obtidos pelo ensaio de citotoxicidade com MTT.....113

## LISTA DE REAÇÕES

Reação 1 - Hidrólise da L-asparagina e L-glutamina catalisadas pela enzima L-asparaginase (ASNase).....20
Reação 2 - Transamidação da L-glutamina para síntese de L-asparagina catalisada pela enzima asparagina sintetase (ASNS).....23
Reação 1.1 - Reação de detecção de nitrogênio amoniacal utilizando reagente de Nessler.....42
Reação 1.2 - Representação das três reações enzimáticas do ensaio acoplado a β-NADH para determinação dos parâmetros cinéticos da ASNase usando L-asparagina como substrato.....44
Reação 1.3 - Representação das duas reações enzimáticas do ensaio acoplado a β-NAD+ para determinação dos parâmetros cinéticos da L-asparaginase (ASNase) usando L-glutamina como substrato.....44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| AEP | asparagina endopeptidase |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ASNase | L-asparaginase |
| ASNS | asparagina sintetase |
| BSA | Albumina de Soro Bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*). |
| CDK7 | gene quinase 7 dependente de ciclina (do ingês *Cyclin-dependent kinase 7*) |
| CRISPR | *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* |
| CTSB | catepsina B |
| DLS | *Dynamic Light Scattering* |

| | |
|---|---|
| DM | dupla mutante |
| DMEM | *Dulbecco's Modified Eagle Medium* |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DNTP's | desoxirribonucleotídeos |
| DTT | ditiotreitol |
| EcA | L-asparaginase de *Escherichia coli* nativa |
| EDTA | ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ELISA | ensaio de imunoabsorção enzimática |
| ErA | L-asparaginase de *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) nativa |
| FACS | *Fluorescence Activated Cell Sorting* |
| FDA | *Food and Drug Administration* |
| FPLC | *Fast Protein Liquid Chromatography* |
| GDH | glutamato desidrogenase |
| GFP | Proteína verde fluorescente (do inglês *Green Fluorescent Protein*) |
| GLNase | L-glutaminase |
| HRP | *horseradish peroxidase* |
| IEDB | *Immune Epitope Data Base and Analysis Resource* |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| IPTG | isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídio |
| $K_{0,5}$ | constante de substrato para meia saturação |
| $k_{cat}$ | constante catalítica |
| $k_{cat}/ K_m$ | eficiência catalítica |
| $K_m$ | constante de Michaelis-Menten |
| LB | *Lysogeny broth* |
| LLA | Leucemia linfoblástica/ linfoide aguda |
| MDH | malato desidrogenase |
| MEM | *Minimum Essential Media* |
| MM | massa molecular |
| MTT | 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio |
| OPD | dicloridrato de o-fenilenodiamina |
| PCR | *Polymerase Chain Reaction* |
| qPCR | PCR em Tempo Real (do inglês *Quantitative Polymerase Chain Reaction* ) |
| PDB | *Protein Data Bank* |

| | |
|---|---|
| peg_EcA | L-asparaginase de *Escherichia coli* peguilada |
| pI | ponto isoelétrico |
| PMSF | fluoreto de fenilmetilsulfonil |
| PSA | persulfato de amônio |
| PVDF | fluoreto de polivinilideno |
| RPA3 | gene Proteína de Replicação A3 ( do inglês *Replication Protein A3*) |
| RPMI 1640 | *Roswell Park Memorial Institute 1640* |
| SDS | dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio |
| SFB | soro fetal bovino |
| SOC | *Super Optimal broth with Catabolite repression* |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina |
| TGO | transaminase glutâmico oxalacética |
| $V_0$ | velocidade inicial |
| VC | Volume de coluna |
| $V_{máx}$ | velocidade máxima |
| WT | selvagem (do inglês *wild-type*) |
| β-$NAD^+$ | β - dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado |
| β-NADH | β - dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido |

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO ..... 17
Leucemias: uma breve contextualização ..... 17
Leucemia Linfocítica Aguda (LLA): características e tratamento ..... 18
A L-asparaginase como agente quimioterápico ..... 20
Efeitos adversos ocasionados pela administração da L-asparaginase ..... 21
A importância do estudo da L-asparaginase ..... 23
REFERÊNCIAS ..... 24
OBJETIVOS ..... 29
CAPÍTULO 1 ..... 30
Caracterização das proteoformas mutantes da L-asparaginase de *Dickeya chrysanthemi* ..... 30
1.1. INTRODUÇÃO ..... 31
1.1.1. Características das L-asparaginases ..... 31
1.1.2. L-asparaginase de *Dickeya chrysanthemi* ..... 32
1.1.3. Efeitos adversos relacionados com a hidrólise de L-glutamina ..... 34
1.1.4. Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório ..... 34
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 36
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 36
1.3.1. Extração de plasmídeos ..... 37
1.3.2. Confirmação da presença inserto após extração plasmidial ..... 37
1.3.3. Transformação em *Escherichia coli DH5α* ou *BL21(DE3)* ..... 38
1.3.4. Expressão de proteínas em *E. coli BL21(DE3)* ..... 38
1.3.5. Choque osmótico ..... 38
1.3.6. Determinação do ponto isoelétrico (pI) ..... 39
1.3.7. Purificação das proteínas ..... 39
1.3.7.1. Troca Iónica ..... 39
1.3.7.2. Cromatografia de Exclusão molecular ..... 40
1.3.8. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) ..... 40
1.3.9. Concentração e Quantificação das proteínas ..... 41
1.3.10. Espalhamento dinâmico de Luz ..... 41
1.3.11. Análise de dicroísmo circular ..... 42
1.3.12. Determinação da Atividade Específica ..... 42

1.3.12.1. Ensaio colorimétrico ..... 42
1.3.12.2. Ensaio acoplado ..... 43
1.3.13. Determinação dos parâmetros cinéticos ..... 45
1.3.14. Determinação do pH ótimo e temperatura ótima ..... 45
1.3.15. Estabilidade na presença de soro humano *in vitro* ..... 45
1.3.16. Avalição da resistência proteolítica ..... 46
1.3.17. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) ..... 46
1.3.18. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* ..... 47
1.4. RESULTADOS ..... 47
1.4.1. Seleção das proteoformas mutantes ..... 47
1.4.1.1. Expressão e purificação das proteoformas mutantes ..... 47
1.4.1.2. Determinação da atividade específica das dez proteoformas ..... 49
1.4.2. Caracterização da proteoforma selecionada ..... 51
1.4.2.1. Avaliação das mutações, pureza, estrutura secundária e quaternária da proteína ..... 51
1.4.2.2. Determinação da atividade específica e parâmetros cinéticos para L-asparagina ..... 55
1.4.2.3. Determinação da atividade específica e parâmetros cinéticos para L-glutamina ..... 57
1.4.2.4. Determinação do pH ótimo, atividade em diferentes temperaturas e influência de cofatores ..... 60
1.4.2.5. Avaliação da estabilidade enzimática *in vitro* na presença de soro humano ..... 61
1.4.2.6. Avaliação do potencial imunogênico *in silico* e *in vitro* ..... 63
1.4.2.7. Avaliação de resistência a proteases séricas humanas ..... 65
1.4.2.8. Potencial citotóxico da proteoforma DM em células de LLA *in vitro* ..... 66
1.5. DISCUSSÃO ..... 68
1.6. CONCLUSÃO ..... 73
1.7. PERSPECTIVAS ..... 73
REFERÊNCIAS ..... 74
CAPÍTULO 2 ..... 80
Avaliação da influência da proteína Catepsina B no mecanismo de resistência ao tratamento da LLA com L-asparaginase ..... 80
2.1. INTRODUÇÃO ..... 81
2.1.1. Resistência ao tratamento da LLA ..... 81
2.1.2. Proteína Catepsina B ..... 82
2.1.3. Estudo proposto da relação CTSB e ASNase no tratamento da LLA ..... 83

2.1.4. Resultados preliminares ..... 84
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 85
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 85
2.3.1. Linhagem de células ..... 85
2.3.2. Plasmídeos ..... 85
2.3.3. Meios de cultura ..... 86
2.3.4. Obtenção das células *knockout* para *CTSB* ..... 86
2.3.4.1. Extração de plasmídeo ..... 86
2.3.4.2. Transformação das células quimicamente competentes ..... 87
2.3.4.3. Confirmação da construção por sequenciamento ..... 87
2.3.4.4. Cultura de células ..... 87
2.3.4.5. Produção de partículas virais ..... 88
2.3.4.6. Infecção das células ..... 88
2.3.4.7. Extração do DNA genômico e qPCR ..... 89
2.3.5. Confirmação da edição por análise da expressão da proteína CTSB nas células REHcas9 + sgRNAs e sequenciamento ..... 90
2.3.5.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) ..... 90
2.3.5.2. Western Blotting ..... 90
2.3.5.3. Ensaio de atividade para catepsina B ..... 91
2.3.5.4. Clonagem no vetor TOPO para confirmação da edição do gene *CTSB* por sequenciamento ..... 92
2.3.6. Obtenção das enzimas ASNases ..... 93
2.3.6.1. Expressão de ASNases em *E. coli* BL21(DE3) ..... 93
2.3.6.2. Choque osmótico ..... 93
2.3.6.3. Purificação de proteínas ..... 94
2.3.6.4. Quantificação de proteínas ..... 95
2.3.6.5. Determinação da atividade específica das ASNases ..... 95
2.3.7. Ensaio de viabilidade celular/citotoxicidade ..... 96
2.4. RESULTADOS ..... 96
2.4.1. Construção das células REH *knockout* para a proteína CTSB ..... 96
2.4.2. Confirmação do *knockout* da proteína CTSB ..... 102
2.4.3. Avaliação da influência da proteína CTSB na resposta ao tratamento com ASNase ..... 108
2.5. DISCUSSÃO ..... 113

2.6. CONCLUSÃO ..... 115
2.7. PERSPECTIVAS ..... 115
REFERÊNCIAS ..... 116
ANEXO A – MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-15b ..... 120
ANEXO B – ENSAIO DE ATIVIDADE ASPARAGINÁSICA DAS PROTEOFORMAS MUTANTES ..... 121
ANEXO C - ENSAIO DE ATIVIDADE GLUTAMINÁSICA DAS PROTEOFORMAS MUTANTES ..... 123
ANEXO D – ARTIGO PUBLICADO (primeira página) ..... 125
ANEXO E – MAPA DO PLASMÍDEO LGR (Lenti_sgRNA-EFS_GFP) ..... 126
ANEXO F – MAPA DO PLASMÍDEO psPAX2 ..... 127
ANEXO G – MAPA DO PLASMÍDEO pMD2.G ..... 128
ANEXO H – WESTERN BLOTTING PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA CTSB NAS CÉLULAS REH E HEPG2 ..... 129
ANEXO I – ANÁLISE DA SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS TRANSCRITOS DA PROTEÍNA CTSB APÓS A EDIÇÃO ..... 130
ANEXO J – APROVAÇÃO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA ..... 134
ANEXO L – FICHA DO ALUNO ..... 135

# INTRODUÇÃO

## Leucemias: uma breve contextualização

As leucemias são neoplasias sanguíneas caracterizadas por alterações nos glóbulos brancos tanto na corrente sanguínea, quanto na medula óssea. Na medula óssea ocorre a diferenciação celular entre as células mieloides e as células linfoides. As células mieloides são precursoras dos granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos; já as células linfoides dão origem a linfoblastos, linfócitos T, linfócitos B e células *Natural killers* (NK) (figura 1). Entretanto, durante o processo de diferenciação, alterações genéticas podem levar as células a um processo de maturação e proliferação anormal, dando origem a leucemia (ROSE-INMAN; KUEHL, 2014).

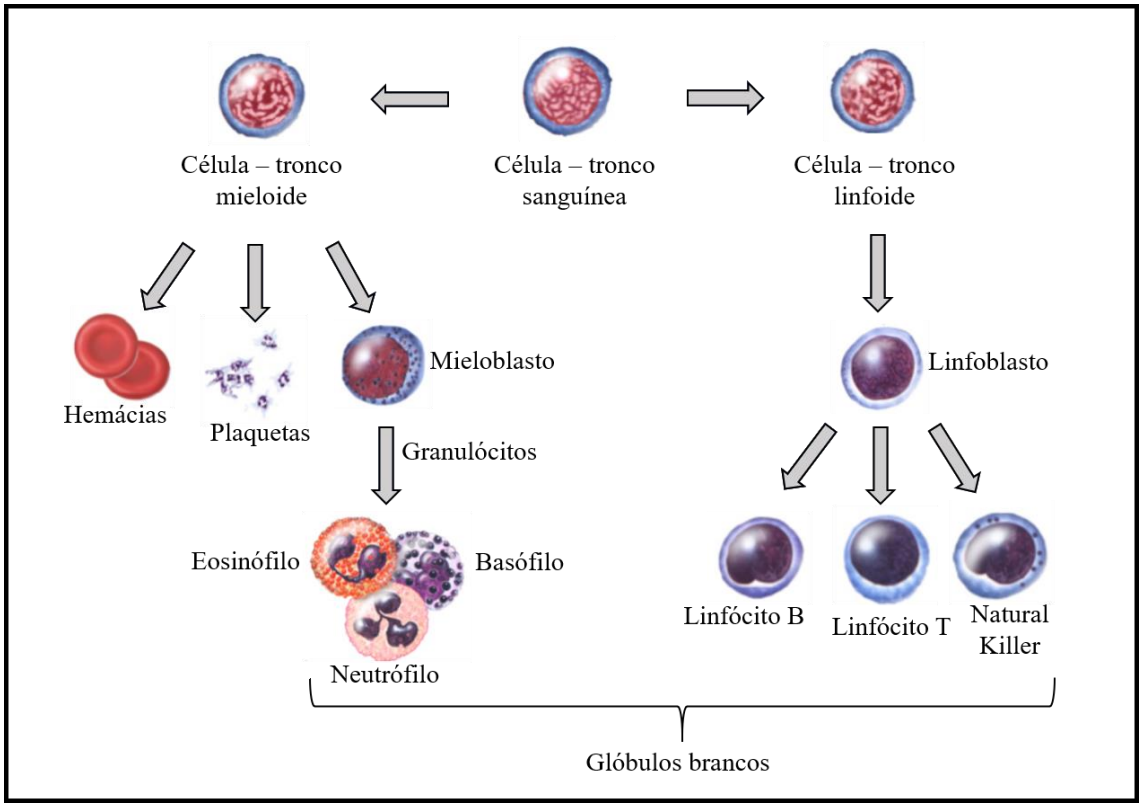



Figura 1- Hematopoese. Processo de diferenciação das células mieloides e linfoides a partir da célula tronco dando origem as células sanguíneas maduras. Fonte: adaptado de (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2021).

A classificação da leucemia é feita de acordo com o tipo de glóbulo branco alterado, podendo ser de origem linfocítica (linfoide ou linfoblástica) ou mieloide (mieloblástica), e subdividida de acordo com o tempo de progressão da doença, aguda (progressão rápida) ou

crônica (progressão lenta). Dentre os diversos tipos de leucemia, os quatro tipos mais comuns são: leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crônica (LLC) e leucemia mieloide crônica (LMC) (BURKE; STARTZELL, 2008).

Em 2018, as leucemias representaram cerca de 2,4% dos novos casos de câncer e 3,2% dos óbitos por câncer em todo o mundo, cerca de 70% dos casos de leucemia foram fatais (BRAY et al., 2018). As leucemias são mais frequentes em homens do que em mulheres, a incidência varia de acordo com o país, e o tipo de leucemia está relacionada com a faixa etária do indivíduo (DONG et al., 2020; MIRANDA-FILHO et al., 2018).

Dos quatro tipos mais comuns de leucemia, a LLA possui maior incidência em crianças e é rara em adultos, enquanto que a LMA, LLC e LMC são as mais comuns em adultos e de baixa incidência em crianças. Os fatores de riscos ainda não são completamente conhecidos, mas sabe-se que o tipo de leucemia, as suas alterações genéticas e a idade do indivíduo estão diretamente relacionadas com o prognóstico da doença (JULIUSSON; HOUGH, 2016; REDAELLI et al., 2005).

## Leucemia Linfocítica Aguda (LLA): características e tratamento

A LLA representa cerca de 25% dos casos de câncer infantil e 80% dos casos de leucemia infantil. A maior incidência da doença acontece entre 1 e 5 anos de idade. (KATZ et al., 2015; PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2021). Apesar da menor incidência na fase adulta, o que representa cerca de 1% de todos os casos de câncer em adultos, aproximadamente 40% dos casos de LLA são observados em adultos acima dos 20 anos (BURKE; DOUER, 2014; KATZ et al., 2015).

Existem dois tipos de classificação para LLA, a feita pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de acordo o imunofenótipo, células B (B-LLA) ou células T (T-LLA) e pelas características citogenéticas dessas células (ARBER et al., 2016); e a classificação *French-American-British* (FAB) baseada no imunofenótipo e nas características morfológicas das células (REDAELLI et al., 2005). A B-LLA a mais comum entre os pacientes, representa cerca de 90% dos casos infantis e 75% em adultos, enquanto que a T-LLA compreende cerca de 10% a 25% dos casos (PAUL; KANTARJIAN; JABBOUR, 2016; RICHARD-CARPENTIER; KANTARJIAN; JABBOUR, 2019).

Quando um paciente é diagnosticado com LLA o protocolo de tratamento mais adequado é determinado de acordo com a classificação do tipo de LLA, visando obter a morte das células neoplásicas e controlar os efeitos adversos, os quais são recorrentes durante o

tratamento. Em geral os protocolos são compostos por diferentes classes de medicamentos (glicocorticoides, agentes antimetabolitos, alcaloides, antraciclinas, enzima, etc.) e são divididos em quatro fases (indução, intensificação ou consolidação, manutenção e profilaxia do Sistema Nervoso Central (SNC)) (CONDUTAS DO INCA/MS, 2001; MALARD; MOHTY, 2020; REDAELLI et al., 2005).

Os glicocorticoides, prednisona e dexametasona, possuem ação citotóxica através da inibição da produção de citocinas, alteração da expressão de oncogenes e parda do ciclo celular. Os antimetabólitos, como o metotrexato, inibem a síntese *de novo* de purinas e pirimidinas, ocasionando a morte celular. Os alcaloides, como a vincristina, atuam no ciclo celular bloqueando a mitose. As antraciclinas, como a doxorubicina, levam a morte celular por serem agentes intercalantes de DNA, por inibirem a topoisomerase II e por produzirem espécies reativas de oxigênio. A enzima L-asparaginase atua na depleção de aminoácido essencial para síntese proteica das células leucêmicas (AL-MAHAYRI; PATRINOS; ALI, 2017).

Na fase de indução o objetivo é alcançar a remissão completa da doença (< 5% de blastos); a fase de intensificação ou consolidação visa manter a remissão completa por um longo período de tempo; e a fase de manutenção tem o objetivo de matar células tumorais residuais; a profilaxia de SNC é aplicada para prevenir e combater a infiltração das células leucêmicas no SNC através de irradiação craniana. As quatro fases são aplicadas em crianças e adultos, diferenciando as doses, frequência de administração e tempo de tratamento (MALARD; MOHTY, 2020; REDAELLI et al., 2005).

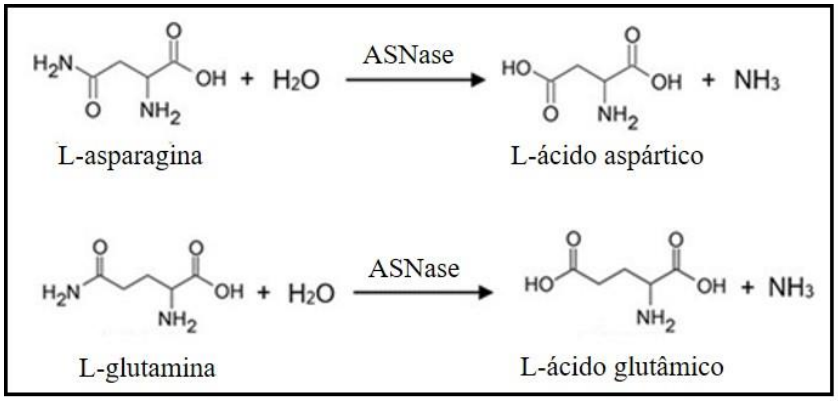
Na década de 70, a remissão da LLA (pacientes que não apresentam evidências clínicas da doença) era observada em 80% a 90% dos casos, porém a taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos era observada somente em 10% a 20% dos pacientes. Atualmente, a remissão da doença acontece em 98% dos pacientes e a sobrevida livre de doença em 5 anos aumentou para 80% a 90% nos casos de LLA infantil. Em adultos somente de 30% a 40% dos pacientes alcançam a sobrevida livre de doença em 5 anos (BURKE; DOUER, 2014; KATZ et al., 2015; PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2021).

O avanço no tratamento da LLA ao longo das décadas foi em grande parte devido à inclusão da enzima L-asparaginase (ASNase) nos protocolos de quimioterapia (HUYNH; BERGERON, 2017; KUMAR et al., 2014). A atividade antitumoral dessa enzima foi identificada na década de 60 e a partir da década seguinte, a ASNase começou a ser incorporada aos protocolos de quimioterapia (ANDRADE; BORGES; SILVEIRA, 2014; SHRIVASTAVA et al., 2016). O uso da ASNase é comum em todos os grupos e tratamentos

(alto, médio ou baixo risco), está presente nas fases de indução e intensificação durante o tratamento e é considerada medicamento essencial na terapia da LLA (KUMAR et al., 2014; MALARD; MOHTY, 2020; REDAELLI et al., 2005).

**A L-asparaginase como agente quimioterápico**

A ASNase é uma amidohidrolase (E.C.3.5.1.1) que catalisa a hidrólise dos aminoácidos L-asparagina e L-glutamina em L-ácido aspártico ou L-ácido glutâmico, e amônia (reação 1). Muitos linfoblastos de células leucêmicas, diferentemente das células saudáveis, não possuem ou expressam baixos níveis da enzima asparagina sintetase (ASNS), dependendo da obtenção da L-asparagina extracelular para manutenção da síntese proteica. A ASNase age depletando a L-asparagina da corrente sanguínea, levando as células leucêmicas ao processo apoptótico (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; RAETZ; SALZER, 2010).




Reação 1 - Hidrólise da L-asparagina e L-glutamina catalisadas pela enzima L-asparaginase (ASNase).

A primeira ASNase a ser utilizada como medicamento foi obtida da bactéria *Escherichia coli* na forma nativa. Posteriormente, foram produzidas a enzima de *E. coli* peguilada (peg_ASNase), conjugada a com monometoxi-polietilenoglicol (mPEG), e a enzima advinda da bactéria *Dickeya chrysanthemi*, também nomeada como *Erwinia chrysanthemi* ou *Pectobacterium chrysanthemi* (SAMSON et al., 2005), na forma nativa (KUMAR et al., 2014; PIETERS et al., 2008).

As ASNases de *E. coli* e *D. chrysanthemi* possuem um elevado grau de similaridade na sequência de aminoácidos e na estrutura terciária e quaternária das proteínas (POKROVSKAYA et al., 2022). Essas enzimas possuem o mesmo mecanismo de ação, mas diferem quanto a afinidade pelo substrato L-glutamina. A atividade glutaminásica dessas

enzimas corresponde de 2 a 10 % da atividade asparaginásica, sendo que a ASNase de *D. chrysanthemi* é mais ativa para L-glutamina do que as enzimas derivadas de *E. coli* (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

A peguilação realizada na peg_ASNase proporcionou algumas vantagens no tratamento da LLA. A meia-vida sérica da enzima passou de 1,44 ± 0,35 dias para 5,73 ± 3,24 dias após a peguilação, além de diminuir a formação anticorpos anti-ASNase. Isso possibilitou um maior intervalo na administração e diminuição da dose aplicada. A ASNase de *D. chrysanthemi* possui meia-vida de 0,65 ± 0,13 dias, sendo necessário o aumento da dose e da frequência de administração; porém, vem sendo utilizada com sucesso em substituição as formulações derivadas de *E. coli* quando os pacientes apresentam hipersensibilidade ou resistência (RAETZ; SALZER, 2010).

## Efeitos adversos ocasionados pela administração da L-asparaginase

Uma das limitações no uso das ASNases é a alta incidência de efeitos adversos. Em adultos, esses efeitos são mais acentuados do que em crianças e jovens adultos. A preocupação com a elevada toxicidade da enzima limita o seu uso nesses pacientes (BURKE; DOUER, 2014; DOUER, 2008).

A disfunção hepática é um efeito adverso comum e geralmente é normalizada algumas semanas após a descontinuação do uso da enzima. Complicações no sistema nervoso central são relatadas em até 33% dos pacientes. Já a hiperglicemia aparece em 11% a 19% dos pacientes e é controlada em alguns casos com administração de insulina (ANDRADE; BORGES; SILVEIRA, 2014; HUNGER; MULLIGHAN, 2015; RAETZ; SALZER, 2010).

No entanto, algumas reações adversas requerem a interrupção ou descontinuação do tratamento devido ao risco de óbito. Essa conduta é mais comumente observada em pacientes que desenvolvem pancreatite, diagnosticada entre 2% a 18% dos pacientes; tromboembolismo, associado com a redução da síntese de proteínas hemostáticas, comprometida pela diminuição de L-asparagina disponível, que pode acometer até 36% dos pacientes; e hipersensibilidade, observada em 60% dos pacientes, comumente associada à produção de anticorpos anti-ASNase, e é considerada o efeito adverso mais significante durante o tratamento (ANDRADE; BORGES; SILVEIRA, 2014; HUNGER; MULLIGHAN, 2015; RAETZ; SALZER, 2010).

As reações de hipersensibilidade estão associadas à origem bacteriana das enzimas, e a formação de anticorpos anti-ASNase e podem se manifestar de forma clínica (por meio de

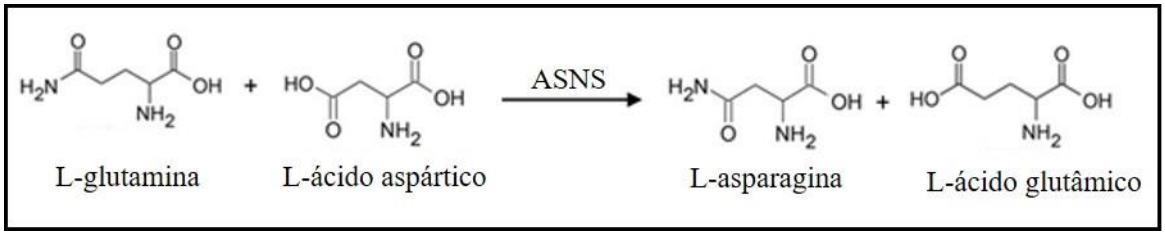
reações alérgicas, urticária, eritema, anafilaxia), ou assintomática na forma de inativação enzimática silenciosa (ASSELIN; RIZZARI, 2015; PIETERS et al., 2011; RAETZ; SALZER, 2010). A reação de hipersensibilidade com formação de anticorpos é mais acentuada em pacientes que utilizam a ASNase de *E. coli*, relatada em 60% dos casos ao longo do tratamento. No entanto, 29% dos pacientes não apresentam as manifestações clínicas. A peg_ASNase é menos imunogênica, com formação de anticorpos de 2% a 18% dos casos, enquanto que para a ASNase de *D. chrysanthemi* a presença de anticorpos é relatada de 8% a 33% dos pacientes. A formação dos anticorpos contribui para o processo de inativação enzimática e comprometimento da eficácia do tratamento (ASSELIN; RIZZARI, 2015; FIGUEIREDO; COLE; DRACHTMAN, 2016; VAN DER SLUIS et al., 2016).

Além da inativação por anticorpos, a ação de proteases também vem sendo relacionada à inativação da enzima. Duas cisteíno-proteases já foram relacionadas com a degradação da ASNase: a catepsina B (CTSB) e a asparagina endopeptidase (AEP) (OFFMAN et al., 2011; PATEL et al., 2009; VAN DER MEER et al., 2014, 2017). Foi demonstrado *in vitro*, que a ASNase de *E. coli* é degradada na presença de ambas as proteases, enquanto que a ASNase de *D. chrysanthemi* é sensível somente a CTSB (PATEL et al., 2009). Posteriormente, foi observado um aumento da meia-vida da ASNase de *D. chrysanthemi* em um paciente que possuía uma mutação no gene codificante da CTSB (VAN DER MEER et al., 2014). Essa observação foi comprovada também através de camundongos *knockout* para o gene *CTSB* que apresentaram uma maior meia-vida sérica da ASNase em comparação aos camundongos selvagens (VAN DER MEER et al., 2017).

Quando as manifestações clínicas ou assintomáticas de hipersensibilidade ou de inativação da enzima são identificadas, é necessária a substituição do medicamento por outra ASNase (ASSELIN; RIZZARI, 2015; SHRIVASTAVA et al., 2016). A primeira linha de tratamento para LLA são as enzimas derivadas de *E. coli* (nativa ou peguilada), dependendo do país. A ASNase de *D. chrysanthemi* é utilizada como segunda linha de tratamento, em substituição as enzimas de *E. coli*. Não é aconselhável a substituição da ASNase de *E. coli* por peg_ASNase durante o tratamento devido a reação-cruzada entre os anticorpos formados por essas formulações; nesses casos, utiliza-se a ASNase de *D. chrysanthemi* que é imunologicamente distinta (FIGUEIREDO; COLE; DRACHTMAN, 2016; SHRIVASTAVA et al., 2016).

Além da ação de proteases e anticorpos, a expressão de *ASNS* pelas células de LLA é um fator de importância para o tratamento com ASNase. Alguns tipos de LLA são naturalmente resistentes ao tratamento por suas características genéticas. Algumas células de

LLA expressam naturalmente altos níveis de *ASNS*, gene responsável pela síntese de L-asparagina usando L-glutamina e L-ácido aspártico como substrato (reação 2); outras, durante o tratamento em resposta à rápida depleção de L-asparagina, têm seus níveis de expressão de ASNS aumentados para suprir a deficiência desse aminoácido. Dessa forma, as células passam a apresentar resistência ao tratamento (CHEN, 2015; LOMELINO et al., 2017).




Reação 2 - Transamidação da L-glutamina para síntese de L-asparagina catalisada pela enzima asparagina sintetase (ASNS).

Outro mecanismo de resistência que vem sendo estudado é o processo de autofagia celular. A autofagia vem se mostrado importante na sobrevivência de células tumorais durante a privação de aminoácidos. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o uso de inibidores de autofagia em conjunto com a ASNase aumenta a eficácia do tratamento (POLAK et al., 2019; TAKAHASHI et al., 2017; WANG et al., 2021).

**A importância do estudo da L-asparaginase**

A busca por novas alternativas de ASNase se faz necessária não só pelos efeitos adversos associados ao tratamento, mas também pelo desabastecimento desse medicamento no mundo. A não utilização da ASNase compromete significativamente a eficácia do tratamento da LLA, e, mesmo sendo a primeira linha de tratamento, a ASNase é um dos quimioterápicos que frequentemente entram em falta no mercado (GOODMAN et al., 2016; GUPTA et al., 2020; MARINI et al., 2019).

Aqui no Brasil, em 2013, o único registro ativo na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para comercialização da ASNase nativa obtida a partir da bactéria *E. coli* (ELSPAR®) da empresa Laboratórios Bagó do Brasil S/A, venceu (https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351016781200780/?nomeProduto=elspar, acesso em 13/02/2022), e com a suspensão da produção do medicamento ELSPAR® pelo laboratório americano *Merck Sharp & Dohme*, os Laboratórios Bagó do Brasil S/A, responsável pela importação e comercialização, não obteve a renovação do registro.

Desde então, de acordo com Ofício-Circular nº 1/2018/SCTIE/GAB/SCTIE/MS, para suprir o abastecimento nacional, o Ministério da Saúde (MS) passou a realizar a importação emergencial desse medicamento (https://saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/assistencia-farmaceutica/notas-tecnicas/anexo_01.pdf, acesso em 13/02/2022).

Desde 2013, o Ministério da Saúde importou ASNase de duas marcas. De 2013 a 2017, a L-asparaginase utilizada nos hospitais brasileiros passou a ser a ALGINASA®, fabricada pela empresa *Medac* em parceria com a empresa *Kyowa Hakko Kirin Co. LTDA*. Em 2017, o governo brasileiro passou a importar o medicamento LEUGINASE® produzido pela empresa *Beijing SL Pharmaceutical*. No entanto, a nova aquisição do Ministério da Saúde trouxe dúvidas sobre a qualidade, eficácia e segurança do medicamento devido à presença de contaminantes (ZENATTI et al., 2018).

Em 2018, a ANVISA concedeu o registro para comercialização do medicamento ONCASPAR®, ASNase de *E. coli* peguilada, para o Laboratório Servier do Brasil LTDA (https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351771428201819/?substancia=7355&situacaoRegistro=V, acesso em 13/02/2022). Em 2019, uma segunda formulação foi aprovada, o medicamento SPECTRILA® para o Laboratório Bagó do Brasil S/A (https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351567187201724/?substancia=906&situacaoRegistro=V, acesso em 13/02/2022). O medicamento SPECTRILA® é formulado com a ASNase de *E. coli* produzida na bactéria *E. coli* utilizando a técnica de DNA recombinante (BRUMANO et al., 2019; VAN DER SLUIS et al., 2018).

Apesar de termos duas formulações aprovadas para comercialização no Brasil, os dois medicamentos são derivados da bactéria de *E. coli*. Portanto, os pacientes que desenvolverem reações de hipersensibilidade a uma dessas formulações não possuem alternativa para continuidade do tratamento, uma vez que a segunda linha de tratamento para esses casos é a utilização de ASNase de *D. chrysanthemi*. A não utilização do uso de ASNase nos casos de hipersensibilidade reduz as chances de um bom prognóstico (GUPTA et al., 2020; MARINI et al., 2019).

## REFERÊNCIAS

AL-MAHAYRI, Zeina N.; PATRINOS, George P.; ALI, Bassam R. Pharmacogenomics in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Promises and limitations. **Pharmacogenomics**, *[S. l.]*, v. 18, n. 7, p. 687–699, 2017. DOI: 10.2217/pgs-2017-0005.

ANDRADE, Augusto F.; BORGES, Kleiton S.; SILVEIRA, Vanessa S. Update on the use of L-asparaginase in infants and adolescent patients with acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, *[S. l.]*, v. 8, p. 95–100, 2014. DOI: 10.4137/CMO.S10242.

ARBER, Daniel A.; ORAZI, Attilio; HASSERJIAN, Robert; THIELE, Jürgen; BOROWITZ, Michael J.; LE BEAU, Michelle M.; BLOOMFIELD, Clara D.; CAZZOLA, Mario; VARDIMAN, James W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, *[S. l.]*, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 2016. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544. Disponível em: http://www.ukm.my/geografia.

ASSELIN, Barbara; RIZZARI, Carmelo. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. **Leukemia and Lymphoma**, *[S. l.]*, v. 56, n. 8, p. 2273–2280, 2015. DOI: 10.3109/10428194.2014.1003056.

BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; SIEGEL, Rebecca L.; TORRE, Lindsey A.; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, *[S. l.]*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.

BRUMANO, Larissa Pereira et al. **Development of L-asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles**. [s.l: s.n.]. v. 6 DOI: 10.3389/fbioe.2018.00212.

BURKE, Patrick W.; DOUER, Dan. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. **Acta Haematologica**, *[S. l.]*, v. 132, n. 3–4, p. 264–273, 2014. DOI: 10.1159/000360204.

BURKE, Vernon P.; STARTZELL, James M. The Leukemias. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, *[S. l.]*, v. 20, n. 4, p. 597–608, 2008. DOI: 10.1016/j.coms.2008.06.011.

CHEN, Shih Hsiang. Asparaginase Therapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Focus on the Mode of Drug Resistance. **Pediatrics and Neonatology**, *[S. l.]*, v. 56, n. 5, p. 287–293, 2015. DOI: 10.1016/j.pedneo.2014.10.006. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.pedneo.2014.10.006.

CONDUTAS DO INCA/MS. Leucemias Agudas na Infância e Adolescência. **Revista Brasileira de Cancerologia**, *[S. l.]*, v. 47, n. 3, p. 245–257, 2001.

DONG, Ying; SHI, Oumin; ZENG, Quanxiang; LU, Xiaoqin; WANG, Wei; LI, Yong; WANG, Qi; WANG, Qi; WANG, Qi. Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. **Experimental Hematology and Oncology**, *[S. l.]*, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1186/s40164-020-00170-6. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s40164-020-00170-6.

DOUER, Dan. Is asparaginase a critical component in the treatment of acute lymphoblastic leukemia? **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, *[S. l.]*, v. 21, n. 4, p. 647–658, 2008. DOI: 10.1016/j.beha.2008.08.004. Disponível em:

http://dx.doi.org/10.1016/j.beha.2008.08.004.

FIGUEIREDO, Lisa; COLE, Peter D.; DRACHTMAN, Richard A. Asparaginase Erwinia chrysanthemi as a component of a multi-agent chemotherapeutic regimen for the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia who have developed hypersensitivity to E. Coli-derived asparaginase. **Expert Review of Hematology**, *[S. l.]*, v. 9, n. 3, p. 227–234, 2016. DOI: 10.1586/17474086.2016.1142370.

GOODMAN, Elizabeth; MERNHARDT, Brooke M.; LI, Yimei; APLENC, Richard; ADAMSON, Peter C. The impact of chemotherapy shortages on COG and local clinical trials: A report from the Children's Oncology Group Elizabeth. **Pediatric blood & cancer**, *[S. l.]*, v. 62, n. 6, p. 940–944, 2016. DOI: 10.1002/pbc.25445.The.

GUPTA, Sumit et al. Impact of asparaginase discontinuation on outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the children's oncology group. **Journal of Clinical Oncology**, *[S. l.]*, v. 38, n. 17, p. 1897–1905, 2020. DOI: 10.1200/JCO.19.03024.

HUNGER, Stephen P.; MULLIGHAN, Charles G. Acute lymphoblastic leukemia in children. **New England Journal of Medicine**, *[S. l.]*, v. 373, n. 16, p. 1541–1552, 2015. DOI: 10.1056/NEJMra1400972.

HUYNH, Van Thu; BERGERON, Sharon. **Asparaginase Toxicities**. [s.l: s.n.]. v. 21

JULIUSSON, Gunnar; HOUGH, Rachael. Leukemia. **Progress in Tumor Research**, *[S. l.]*, v. 43, p. 87–100, 2016. DOI: 10.1159/000447076.

KATZ, Aaron J.; CHIA, Victoria M.; SCHOONEN, Wilma M.; KELSH, Michael A. **Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden**. [s.l.] : Springer International Publishing, 2015. v. 26 DOI: 10.1007/s10552-015-0657-6.

KUMAR, Kuldeep; KAUR, Jagjeet; WALIA, Shefali; PATHAK, Teena; AGGARWAL, Diwakar. L-asparaginase: An effective agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia and Lymphoma**, *[S. l.]*, v. 55, n. 2, p. 256–262, 2014. DOI: 10.3109/10428194.2013.803224.

LOMELINO, Carrie L.; ANDRING, Jacob T.; MCKENNA, Robert; KILBERG, Michael S. Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. **Journal of Biological Chemistry**, *[S. l.]*, v. 292, n. 49, p. 19952–19958, 2017. DOI: 10.1074/jbc.R117.819060. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R117.819060.

MALARD, Florent; MOHTY, Mohamad. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, *[S. l.]*, v. 395, n. 10230, p. 1146–1162, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)33018-1. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1.

MARINI, Bernard L. et al. A single-center multidisciplinary approach to managing the global Erwinia asparaginase shortage. **Leukemia and Lymphoma**, *[S. l.]*, v. 60, n. 12, p. 2854–2868, 2019. DOI: 10.1080/10428194.2019.1608530. Disponível em: https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1608530.

MIRANDA-FILHO, Adalberto; PIÑEROS, Marion; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; MONNEREAU, Alain; BRAY, Freddie. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. **The Lancet Haematology**, *[S. l.]*, v. 5, n. 1, p. e14–e24, 2018. DOI: 10.1016/S2352-3026(17)30232-6. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30232-6.

NARTA, Umesh K.; KANWAR, Shamsher S.; AZMI, Wamik. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, *[S. l.]*, v. 61, n. 3, p. 208–221, 2007. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2006.07.009.

OFFMAN, Marc N.; KROL, Marcin; PATEL, Naina; KRISHNAN, Shekhar; LIU, Ji Zhong; SAHA, Vaskar; BATES, Paul A. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. **Blood**, *[S. l.]*, v. 117, n. 5, p. 1614–1621, 2011. DOI: 10.1182/blood-2010-07-298422. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-07-298422.

PATEL, Naina et al. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. **Journal of Clinical Investigation**, *[S. l.]*, v. 119, n. 7, p. 1964–1973, 2009. DOI: 10.1172/jci37977.

PAUL, Shilpa; KANTARJIAN, Hagop; JABBOUR, Elias J. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mayo Clinic Proceedings**, *[S. l.]*, v. 91, n. 11, p. 1645–1666, 2016. DOI: 10.1016/j.mayocp.2016.09.010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.010.

PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. **PDQ Cancer Information Summaries**, *[S. l.]*, 2021. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389206.

PIETERS, Rob; APPEL, Inge; KUEHNEL, Hans Juergen; TETZLAFF-FOHR, Iris; PICHLMEIER, Uwe; VAN DER VAART, Inekee; VISSER, Eline; STIGTER, Rolinda. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy, and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: A randomized phase 2 clinical trial. **Blood**, *[S. l.]*, v. 112, n. 13, p. 4832–4838, 2008. DOI: 10.1182/blood-2008-04-149443.

PIETERS, Rob; HUNGER, Stephen P.; BOOS, Joachim; RIZZARI, Carmelo; SILVERMAN, Lewis; BARUCHEL, Andre; GOEKBUGET, Nicola; SCHRAPPE, Martin; PUI, Ching Hon. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, *[S. l.]*, v. 117, n. 2, p. 238–249, 2011. DOI: 10.1002/cncr.25489.

POKROVSKAYA, Marina V; POKROVSKY, Vadim S.; ALEKSANDROVA, Svetlana S.; SOKOLOV, Nikolay N.; ZHDANOV, Dmitry D. Molecular Analysis of L-Asparaginases for Clarification of the Mechanism of Action and Optimization of Pharmacological Functions. *[S. l.]*, 2022.

POLAK, Roel et al. Autophagy inhibition as a potential future targeted therapy for ETV6-RUNX1-driven B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, *[S. l.]*, v. 104, n. 4, p. 738–748, 2019. DOI: 10.3324/haematol.2018.193631.

RAETZ, Elizabeth A.; SALZER, Wanda L. Tolerability and efficacy of L-asparaginase therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, *[S. l.]*, v. 32, n. 7, p. 554–563, 2010. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3181e6f003.

REDAELLI, A.; LASKIN, B. L.; STEPHENS, J. M.; BOTTEMAN, M. F.; PASHOS, C. L. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). **European Journal of Cancer Care**, *[S. l.]*, v. 14, n. 1, p. 53–62, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2354.2005.00513.x.

RICHARD-CARPENTIER, Guillaume; KANTARJIAN, Hagop; JABBOUR, Elias. Recent Advances in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Current Hematologic Malignancy Reports**, *[S. l.]*, n. March, p. 106–118, 2019. DOI: 10.1007/s11899-019-00503-1.

ROSE-INMAN, Hayley; KUEHL, Damon. Acute leukemia. **Emergency Medicine Clinics of North America**, *[S. l.]*, v. 32, n. 3, p. 579–596, 2014. DOI: 10.1016/j.emc.2014.04.004. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.emc.2014.04.004.

SAMSON, Régine; LEGENDRE, Jean Bernard; CHRISTEN, Richard; FISCHER-LE SAUX, Marion; ACHOUAK, Wafa; GARDAN, Louis. Transfer of Pectobacterium chrysanthemi (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and Brenneria paradisiaca to the genus Dickeya gen. nov. as Dickeya chrysanthemi comb. nov. and Dickeya paradisiaca comb. nov. and delineation of four novel species, Dick. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, *[S. l.]*, v. 55, n. 4, p. 1415–1427, 2005. DOI: 10.1099/ijs.0.02791-0.

SHRIVASTAVA, Abhinav; KHAN, Abdul Arif; KHURSHID, Mohsin; KALAM, Mohd Abul; JAIN, Sudhir K.; SINGHAL, Pradeep K. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, *[S. l.]*, v. 100, p. 1–10, 2016. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.01.002. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.01.002.

TAKAHASHI, H.; INOUE, J.; SAKAGUCHI, K.; TAKAGI, M.; MIZUTANI, S.; INAZAWA, J. Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. **Oncogene**, *[S. l.]*, v. 36, n. 30, p. 4267–4276, 2017. DOI: 10.1038/onc.2017.59. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/onc.2017.59.

VAN DER MEER, Laurens T. et al. A germ line mutation in cathepsin B points toward a role in asparaginase pharmacokinetics. **Blood**, *[S. l.]*, v. 124, n. 19, p. 3027–3029, 2014. DOI: 10.1182/blood-2014-06-582627.

VAN DER MEER, Laurens T. et al. In vivo imaging of antileukemic drug asparaginase reveals a rapid macrophage-mediated clearance from the bone marrow. **Journal of Nuclear Medicine**, *[S. l.]*, v. 58, n. 2, p. 214–220, 2017. DOI: 10.2967/jnumed.116.177741.

VAN DER SLUIS, Inge M. et al. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. **Haematologica**, *[S. l.]*, v. 101, n. 3, p. 279–285, 2016. DOI: 10.3324/haematol.2015.137380.

VAN DER SLUIS, Inge M. et al. Efficacy and safety of recombinant E. coli asparaginase in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: A randomized multicenter study of the Dutch Childhood Oncology Group. **Pediatric Blood and Cancer**, *[S. l.]*, v. 65, n. 8, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1002/pbc.27083.

WANG, Ziyu; XIE, Qinghong; ZHOU, Haifeng; ZHANG, Min; SHEN, Jie; JU, Dianwen. Amino Acid Degrading Enzymes and Autophagy in Cancer Therapy. **Frontiers in Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 11, n. January, p. 1–9, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2020.582587.

ZENATTI, Priscila Pini; MIGITA, Natacha Azussa; CURY, Nathália Moreno; MENDES-SILVA, Rosângela Aparecida; GOZZO, Fabio Cesar; DE CAMPOS-LIMA, Pedro Otavio; YUNES, José Andrés; BRANDALISE, Silvia Regina. Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of E. coli L-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins. **EBioMedicine**, *[S. l.]*, v. 30, p. 158–166, 2018. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.03.005. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.005.

# OBJETIVOS

1. Avaliar o potencial enzimático de dez proteoformas mutantes da enzima L-asparaginase II de *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) geradas por PCR propensa a erro através da caracterização bioquímica, e determinar o potencial citotóxico dos mutantes que apresentaram os melhores parâmetros enzimáticos.

2. Avaliar o papel da proteína lisossomal Catepsina B no mecanismo de resistência ao tratamento com diferentes L-asparaginases nas células de leucemia linfocítica aguda humana REH.

# CAPÍTULO 1

Caracterização das proteoformas mutantes da L-asparaginase de *Dickeya chrysanthemi*

# 1.1.INTRODUÇÃO

## 1.1.1. Características das L-asparaginases

As L-asparaginases podem ser produzidas por diversos organismos: bactérias, fungos, plantas e mamíferos (BOREK; JASKÓLSKI, 2001; IMADA et al., 1973; KARAMITROS; KONRAD, 2014). Essas proteínas são classificadas em três grandes famílias: a família do tipo *Rhizobium etli*, onde estão presentes enzimas termolábeis; a família do tipo planta, que possuem alta similaridade com aspartil-glucosaminidases; e a família tipo bacteriana, que é subdividida em tipo I (citosólicas e com baixa afinidade pelo substrato) e tipo II (periplasmáticas e com alta afinidade pelo substrato) (BOREK; JASKÓLSKI, 2001).

Apesar de vários organismos produzirem ASNases, nem todas possuem as características necessárias para ação anti-neoplásica. Para ser uma enzima com potencial terapêutico é necessário apresentar uma alta afinidade por L-asparagina e manter os níveis séricos desse aminoácido baixos (BROOME, 1968). Essas características são importantes, pois os níveis de L-asparagina no sangue são de aproximadamente 40 a 80 µM (BOOS et al., 1996; COSTA-SILVA et al., 2020). Diversas ASNases vêm sendo caracterizadas em busca de uma enzima que possa reduzir o número de efeitos adversos e melhorar ainda mais a eficácia do tratamento em pacientes jovens e adultos. No entanto, a combinação de todas as características necessárias para o uso terapêutico é difícil de ser encontrada.

Os seres humanos produzem três enzimas com atividade ASNase, porém as enzimas que já foram caracterizadas possuem uma baixa afinidade por L-asparagina, com um $K_m$ de mM (CANTOR et al., 2014; NOMME; SU; LAVIE, 2014) ou ainda um perfil alostérico também com baixa afinidade pelo substrato ($K_{0,5}$ de mM) (BELVISO et al., 2017; KARAMITROS; KONRAD, 2014). A ASNase 1 (ASP1) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi caracterizada com um perfil alostérico e alta afinidade por L-asparagina ($K_{0,5}$ de 75 µM) sendo capaz de apresentar atividade antitumoral. Porém, mesmo em concentrações mais altas a enzima é incapaz de matar todas as células leucêmicas *in vitro* (COSTA et al., 2016).

Mesmo com a grande diversidade na possibilidade de obtenção, as ASNases utilizadas de fato como medicamento são as de origem bacteriana, pois atendem às características necessárias. A ASNase de *E. coli* e *D. chrysanthemi*, utilizadas no tratamento da LLA, são enzimas do tipo II que possuem alta afinidade por L-asparagina ($K_m$ de µM), o que confere a

elas a capacidade antitumoral e a manutenção dos baixos níveis de L-asparagina sérica (CEDAR; SCHWARTZ, 1967; COSTA-SILVA et al., 2020; DEL CASALE; SOLLITTI; CHESNEY, 1983).

### 1.1.2. L-asparaginase de *Dickeya chrysanthemi*

A ASNase de *D. chrysanthemi*, codificada pelo gene *ansB*, é uma proteína periplasmática constituída de 348 aminoácidos, onde os 21 primeiros resíduos correspondem à sequência peptídeo sinal para localização no periplasma bacteriano (figura 1.1A); portanto, a proteína madura apresenta 327 aminoácidos, com massa molecular de 35,05 kDa. O monômero da proteína é dividido em dois domínios, o N-terminal e o C-terminal que são conectados por um *linker* que compreende do resíduo 197 ao 218, e o seu sítio ativo é constituído somente por resíduos do domínio N-terminal de cada monômero, são eles: Thr-15, Tyr-29, Ser-62, Glu-63, Thr-95, Asp-96, e Lys-168 (figura 1.1B). A proteína se oligomeriza em homotetrâmero funcional formado por dímeros de dímeros (A/C e B/D), como mostra a figura 1.1C (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001a, 2001b; MILLER et al., 1993; NGUYEN; SU; LAVIE, 2016a).

A ASNase de *D. chrysanthemi* possui alta afinidade por L-asparagina, com $K_m$ entre 29 e 58 µM (GERVAIS; FOOTE, 2014; KOTZIA; LABROU, 2007; NGUYEN; SU; LAVIE, 2016b); e para L-glutamina uma menor afinidade, com $K_m$ de 6,7 mM (KOTZIA; LABROU, 2007). A atividade específica para L-asparagina varia entre 118 U/mg e 350 U/mg, e sua atividade glutaminásica corresponde a aproximadamente 10 % da sua atividade asparaginásica (KOTZIA; LABROU, 2007; NGUYEN; SU; LAVIE, 2016b).

A ASNase de *D. chrysanthemi* foi aprovada para o tratamento da LLA pela primeira vez em 1985 no Reino Unido, e só em 2011 foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (SALZER; SEIBEL; SMITH, 2012). Essa enzima é utilizada como segunda linha de tratamento e apesar de requerer um aumento na dose e na frequência de administração devido sua baixa meia-vida sérica em humanos (RAETZ; SALZER, 2010; SALZER; SEIBEL; SMITH, 2012), a sua eficácia clínica é a mesma das enzimas derivadas de *E. coli*, sem alteração na taxa de sobrevida em cinco anos (FIGUEIREDO; COLE; DRACHTMAN, 2016).

**A**

[1]MERWFKSLFVLVLFFVFTASA[22]ADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVK
KLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDTVEESAYFLHLTVKSDKP
VVFVAAMRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNASTLDTFKANEE
GYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMG
AGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVVIRSTRTGNGIVPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKVIQ
EYFHTY[348]

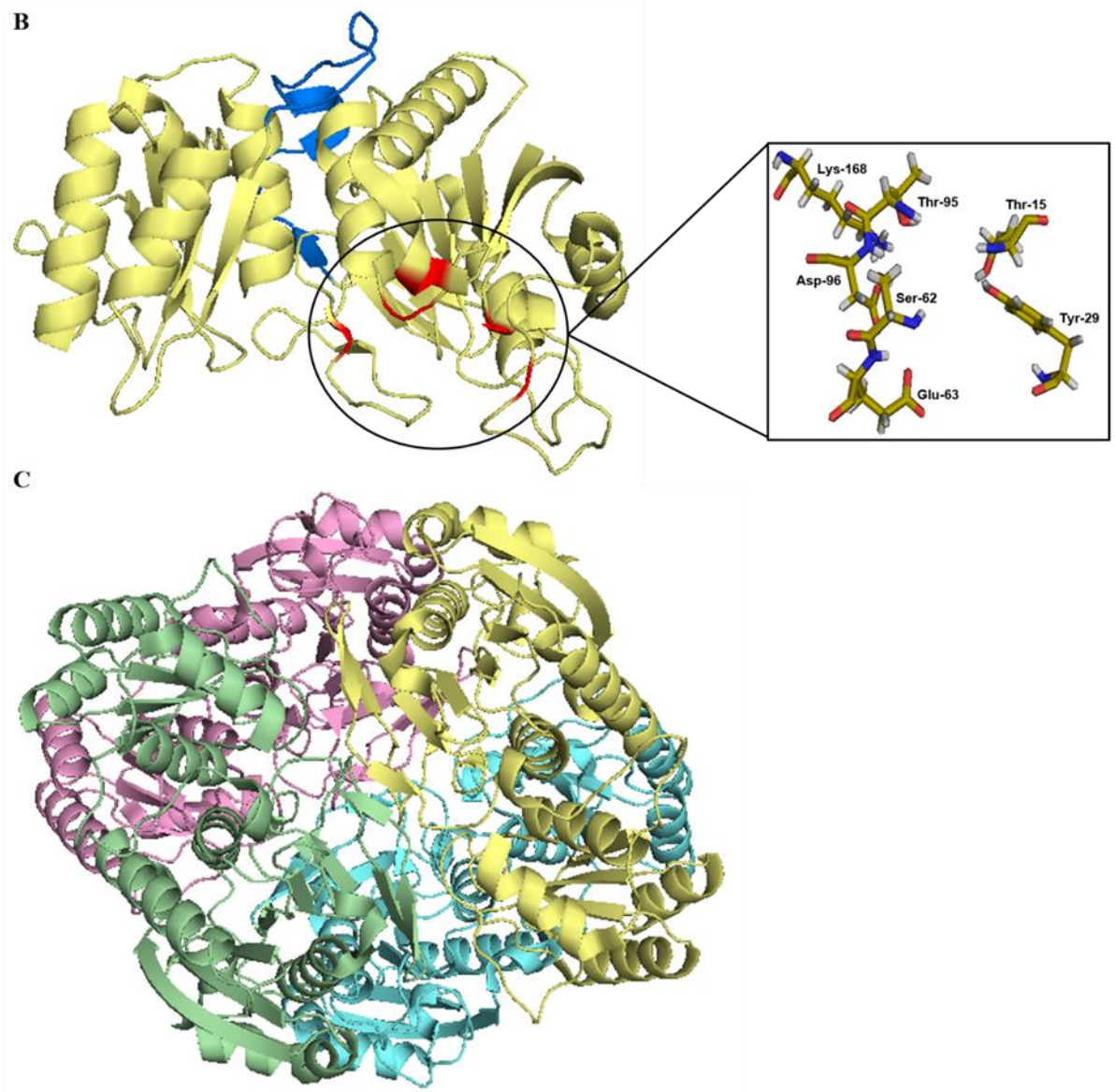



Figura 1.1 - Representação da estrutura da proteína ASNase de *D. chrysanthemi*. A- Estrutura primária da proteína (código Uniprot: P06608), em vermelho está destacado a sequência de sinalização para o periplasma composta por 21 aminoácidos. B- Representação do monômero da proteína com os domínios N-terminal e C-terminal unidos pelo *linker* em azul e o sítio ativo localizado no domínio N-terminal em vermelho com os resíduos pertencentes ao sítio ativo em destaque no quadro ao lado da estrutura. C- Representação do homotetrâmero formado por dímero de dímeros. As figuras foram criadas pelo programa PyMOL utilizando a estrutura 1OJ7 obtida do *Protein Data Bank* (PDB).

### 1.1.3. Efeitos adversos relacionados com a hidrólise de L-glutamina

A produção de anticorpos anti-asparaginase é um efeito adverso comum nos pacientes em tratamento. Assim como a ação de proteases é responsável pela inativa enzimática, os anticorpos também contribuem para e inativação da enzima é ineficácia do tratamento(SALZER; SEIBEL; SMITH, 2012; VAN DER MEER et al., 2017). No entanto, outros efeitos adversos (*e.g.* pancreatite, hiperglicemia, dislipidemia, hepatotoxicidade, tromboembolismo, neurotoxicidade) relacionados com a hidrólise de L-asparagina e L-glutamina e os produtos formados dessa reação também possuem grande impacto na qualidade de vida e continuidade do tratamento (FIGUEIREDO; COLE; DRACHTMAN, 2016; MINOWA et al., 2012; SALZER; SEIBEL; SMITH, 2012).

A hidrólise secundária de L-glutamina potencializa os efeitos adversos da ASNase. Para a ASNase de *D. chrysanthemi*, que apresenta uma maior taxa de hidrólise para L-glutamina em relação as enzimas derivadas de *E. coli*, essa diferença implica, como por exemplo, com uma maior incidência de hiperamonemia nos pacientes (GOSSAI et al., 2018).

O excesso de amônia e o desbalanço nos níveis de L-glutamina e L-ácido glutâmico na corrente sanguínea estão diretamente relacionados com a hepatotoxicidade e neurotoxicidade dos pacientes. Em decorrência dessa toxicidade os pacientes podem apresentar, encefalopatia, náusea, vômito, fadiga. Além disso, a síntese proteica fica comprometida com a redução da concentração de L-glutamina, que além de contribuir para o surgimento da hepatotoxicidade, contribui para o surgimento de coagulopatias. Esses quadros de toxicidade quando aprecem de forma severa podem levar o paciente a óbito (NIKONOROVA et al., 2019; REINERT et al., 2006; STRICKLER et al., 2018).

Para reduzir a toxicidade desse medicamento e melhorar a resposta ao tratamento, estudos de novas enzimas com redução da atividade glutaminásica vêm sendo realizado. Já foi demonstrado *in vivo* que a utilização de uma enzima com menor atividade glutaminásica contribui para redução dos efeitos adversos (NGUYEN et al., 2018; NGUYEN; SU; LAVIE, 2016b).

### 1.1.4. Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório

Com a interrupção do fornecimento do medicamento ASNase em 2013, o nosso grupo de pesquisa passou a estudar alternativas de produção da ASNase. A ASNase de *D. chrysanthemi* possui elevada atividade específica, alta afinidade pelo substrato e é a única

alternativa para os pacientes que apresentam reação de hipersensibilidade às ASNases de *E. coli*, alternativa que ainda não está disponível no Brasil. Entretanto, um elevado número de efeitos adversos ainda é observado, além de possuir uma menor meia-vida sérica (FIGUEIREDO; COLE; DRACHTMAN, 2016; SHRIVASTAVA et al., 2016).

Por isso, utilizando a ASNase de *D. chrysanthemi*, o nosso grupo de pesquisa criou uma biblioteca de mutantes através de mutagênese aleatória por *Polymerase Chain Reaction* propensa a erro (epPCR), com o objetivo de obter enzimas com menos efeitos adversos e melhores parâmetros enzimáticos (CUSTÓDIO, 2018).

Utilizando o vetor de expressão pET-15b (anexo A), a construção pET-15b + *ansB* de *D. chrysanthemi* foi feita de modo que a proteína madura ficasse localizada no periplasma da bactéria (figura 1.2). Desta forma, a cauda de histidina presente no vetor de expressão precede a sequência sinal da proteína, composta por 21 aminoácidos que sinaliza a sua secreção para o periplasma. Assim, a proteína final estaria localizada no meio periplasmático em sua forma madura sem a cauda de histidina.

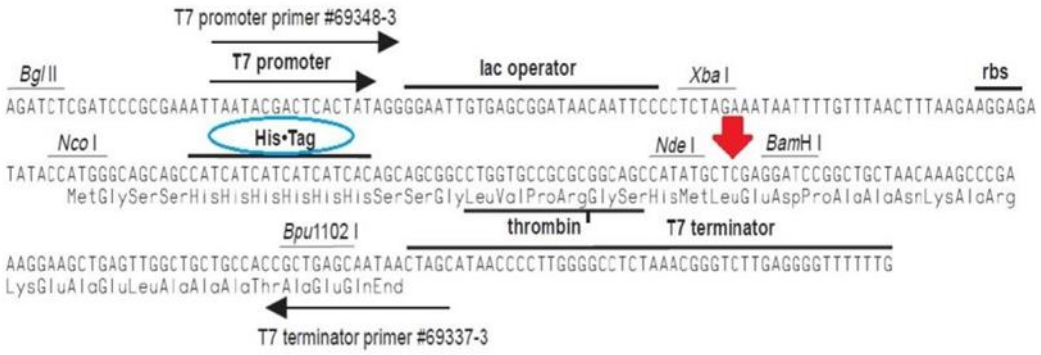



Figura 1.2 - Construção do pET-15b + *ansB* de *D. chrysanthemi*. Sítio múltiplo de clonagem do vetor de expressão pET-15b contendo o iniciador e terminador T7: a seta vermelha indica o local de inserção do gene otimizado; em azul está destacado a cauda de histidina na porção N-terminal que, portanto, fica anterior ao peptídeo sinal da proteína.

Essa construção foi submetida a vários ciclos de reações enzimáticas de epPCR propensa a erro utilizando o kit *GeneMorph Random Mutagenesis* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) para inserção de mutações aleatórias. Os 1.056 clones da biblioteca gerada por epPCR foram cultivados em microplacas e a fração periplasmática foi utilizada para o ensaio de atividade enzimática com reagente de Nessler. Somente 30 dos 1.056 clones apresentaram atividade asparaginásica de no mínimo 80% da atividade da enzima selvagem (WT), os quais foram sequenciados para identificação das mutações. Após o sequenciamento foram identificados 17 clones com uma ou mais mutações no gene *ansB* (CUSTÓDIO, 2018).

Dez dos dezessete mutantes foram selecionados como potenciais candidatos para caracterização nesse trabalho (tabela 1.1).

Tabela 1.1- Proteoformas de ASNase mutantes selecionadas para caracterização

| **Proteoforma** | **Mutação** | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | D175N | | | |
| 2 | K72E | K145Q | | |
| 3 | G67D | R148C | S276N | |
| 4 | G32S | D37E | A42T | |
| 5 | E63D | | | |
| 6 | Q227E | V272M | | |
| 7 | R264C | | | |
| 8 | V187I | Y247D | | |
| 9 | T24I | N51S | T66S | D175N |
| 10 | A142V | P286L | | |

As mutações estão identificadas pela sequência da proteína madura, sem o peptídeo sinal.

## 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar, purificar e avaliar a atividade específica de dez proteoformas mutantes;
- Selecionar as proteoformas mutantes com atividade superior à enzima selvagem;
- Caracterizar bioquimicamente as proteoformas selecionadas;
- Avaliar o potencial citotóxico da proteoforma com melhor parâmetro cinético;

## 1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

**Plasmídeos:** pET-15b da Novagen® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

**Linhagens:** Bactéria *E. coli*:

- *DH5α* [*endA1, hsdR17 ($rk^-$ $mk^+$), supE44, $thi^-$1, recA1, gyrA (Na 1r), relA1, Δ(lacZYA-argF)$_{U169}$ (Φ80lacZΔM15)*] da Novagen® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

- *BL21(DE3)*; [*$F^-$, amp T, hsdSb ($rB^-$ $mb^-$), gal, dcm (DE3)*] da Novagen® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

**Meio de Cultura:** *Lysogeny broth* (LB): 0,5% NaCl, 0,5% extrato de levedura, 1% triptona e adição de 2% de Agar quando o meio for sólido.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou superior obtidos da Sigma-Aldrich, Merck-Millipore, Synth, ou indicados quando de origem diferente.

### 1.3.1. Extração de plasmídeos

Os dez clones selecionados na biblioteca de mutantes foram crescidos em 5 mL de meio LB com adição de 50 µg/mL de carbenicilina (LB + carb) a 37 °C, *overnight* e sob agitação de 180 r.p.m. O inóculo foi utilizado para realização da mini preparação de plasmídeos (miniprep) utilizando o kit *QIAprep® Spin Miniprep* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. A confirmação da extração do plasmídeo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1X (4,84 g de Tris Base; 1,14 mL de ácido acético; 0,37 g de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); $H_2O$ ultrapura para 1 L) com adição de 1,5 µg/mL de brometo de etídeo. A visualização foi feita com auxílio de transiluminador UV (Major Science, Saratoga, CA, EUA).

### 1.3.2. Confirmação da presença inserto após extração plasmidial

A confirmação da presença do inserto no plasmídeo extraído foi realizada por reação de *polymerase chain reaction* (PCR). Utilizamos iniciadores para região do promotor e terminador T7, as quais estão descritas abaixo, presente no vetor de expressão pET-15b que flanqueiam o sítio de inserção do gene.

*Forward:* 5’ TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3’

*Reverse:* 5’ CCG CTG AGC AAT AAC TAG C 3’

Para as reações de PCR foram utilizados 1 mM $MgCl_2$, tampão de PCR 1X, 1,25 mM de desoxirribonucleotídeos (DNTP’s), 15 pmol/µL de cada iniciador, 10 ng de plasmídeo, 2 U/reação de *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), totalizando 10 µL de reação. As condições de amplificação utilizadas foram: uma fase inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 55°C por 30 segundos, extensão do amplificado a 68°C por 1 minuto e 30

segundos e uma fase final de extensão a 68°C por 7 minutos. A amplificação foi realizada utilizando termociclador *Veriti* da *Applied Biosystems* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os resultados da reação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1X com adição de 1,5 μg/mL de brometo de etídeo.

### 1.3.3. Transformação em *Escherichia coli DH5α* ou *BL21(DE3)*

O material obtido com a miniprep, descrita no item 1.3.1, foi utilizado para transformação da linhagem *DH5α* (para estoque dos plasmídeos) e da linhagem *BL21(DE3)* (para expressão da proteína). Em 50 μL das linhagens de *E. coli* eletrocompetentes foram adicionados 50 ng de plasmídeo, seguida de eletroporação a 2,5 kV no equipamento *Gene Pulser® II* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). As células eletroporadas foram ressuspendidas em 1 mL de meio LB e incubadas por 1 hora a 37 °C sob agitação a 180 r.p.m. Após a incubação, 100 μL do conteúdo celular foi inoculado em meio sólido LB + carb e a placa foi incubada a 37°C *overnight*.

### 1.3.4. Expressão de proteínas em *E. coli BL21(DE3)*

Inicialmente, os clones transformantes de *E. coli BL21(DE3)* foram inoculados em meio LB + carb e as células foram cultivadas *overnight* a 37ºC sob agitação de 180 r.p.m. Posteriormente, as células foram diluídas para $OD_{600nm}$ 0,2 em 1L de meio LB + carb e incubadas a 37 °C sob agitação de 220 r.p.m. até atingirem $OD_{600nm}$ 1,0. Em seguida, foi adicionado o indutor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídio (IPTG) para concentração final de 0,1 mM. A indução foi realizada por 22 horas a 37ºC sob agitação de 200 r.p.m. Após esse período, as células foram decantadas por meio de centrifugação a 4.000 x *g* por 20 minutos a 4 °C e o *pellet* celular obtido foi armazenado a -20 °C.

### 1.3.5. Choque osmótico

Os *pellets* obtidos após a expressão foram submetidos a choque osmótico para obtenção da fração periplasmática das células, usando o protocolo adaptado de Harms (1991). Brevemente, o *pellet* obtido a partir de 1 L de cultivo foi ressuspendido em 150 mL de tampão hiperosmótico gelado (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 500 mM Sacarose, 0,5 mM EDTA), mantido no gelo por 5 minutos e centrifugado a 4.000 x *g* por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi

descartado, as células foram ressuspendidas em 30 mL de água ultrapura com adição de 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), mantidas no gelo por 5 minutos e centrifugadas a 4.000 x *g* por 40 minutos a 4 °C. A fração sobrenadante (periplasmática) foi coletada para purificação da enzima L-asparaginase (HARMS et al., 1991).

### 1.3.6. Determinação do ponto isoelétrico (pI)

O ponto isoelétrico de cada proteoforma e da enzima selvagem foi calculado pelo programa de bioinformática *ProtParam* (https://web.expasy.org/protparam/). Para a proteína selvagem e para as proteoformas 1 e de 4 a 10 o pI calculado foi de 7,2, para as proteoformas 2 e 3 o pI foi de 6,3 e 6,6, respectivamente.

### 1.3.7. Purificação das proteínas

#### 1.3.7.1. Troca Iónica

Para a purificação foi utilizada coluna *HiTrap® SP FF* (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EUA) de troca catiônica, em bomba pesristáltica (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EUA). As frações obtidas do choque osmótico das proteínas com pI 7,2 foram tamponadas com 20 mM fosfato de potássio pH 5,8 (purificação 1) e as proteoformas com pI 6,3 e 6,6 foram tamponadas com 20 mM de acetato de sódio pH 5,0 (purificação 2); posteriormente as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose de poro 0,2 μm (Sartorius, Gottingen, Alemanha) antes da purificação.

- **Purificação 1:** a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna (VC) de $H_2O$ ultrapura; equilibrada com 10 VC de 20 mM fosfato de potássio pH 5,8; ativada com 5 VC de 20 mM fosfato de potássio pH 5,8 + 1 M NaCl; lavada com 10 VC 20 mM fosfato de potássio pH 5,8; carregada com a amostra; lavada com 10 VC de 20 mM fosfato de potássio pH 5,8; lavada com 10 VC de 20 mM fosfato de potássio pH 6,6; eluição com 20 mM fosfato de potássio pH 8,0.

- **Purificação 2:** a coluna foi lavada com 10 VC de $H_2O$ ultrapura; equilibrada com 10 VC de 20 mM acetato de sódio pH 5,0; ativada com 5 VC de 20 mM acetato de sódio pH 5,0 + 1 M NaCl; lavada com 10 VC 20 mM acetato de sódio pH 5,0; carregada

com a amostra; lavada com 10 VC de 20 mM acetato de sódio pH 5,0; lavada com 10 VC de 20 mM acetato de sódio pH 5,8; eluição com 20 mM fosfato de potássio pH 8,0.

As amostras foram coletadas da eluição a cada 1 mL e a presença de proteína foi identificada por reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) antes da confirmação por eletroforese.

#### 1.3.7.2. Cromatografia de Exclusão molecular

Após a troca iônica, confirmamos o grau de pureza e alterações na conformação quaternária da proteína por cromatografia de exclusão molecular. Utilizando a coluna *Superdex® 200 Increase 10/300 GL* (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EUA). As frações obtidas da troca catiônica foram concentradas através de ultrafiltração em membrana usando o Amicon-Ultra 15 mL com corte de 10 kDa NMWL com membrana de celulose regenerada (Merck Millipore, Bellerica, MA, EUA) a 4.000 x *g*, 4°C até o volume de 500 µL. A coluna foi equilibrada com 50 mL de tampão 20 mM fosfato de potássio pH 8,0 + 100 mM glicina; em seguida a solução proteica foi aplicada na coluna em fluxo isocrático de 1,0 mL/min. As amostradas eluidas foram coletadas em volume de 0,5 mL.

### 1.3.8. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

A purificação das enzimas foi avaliada por SDS-PAGE redutor (LAEMMLI, 1970). O gel de separação foi preparado utilizando 470 mM de tampão Tris-HCl pH 8,8, 14 % de acrilamida/bis-acrilamida, 0,1 % de persulfato de amônio (PSA) e 10 µL de *N,N,N',N'*tetrametiletilenodiamina (TEMED) (Merck Millipore, Bellerica, MA, EUA). No gel empacotador foram utilizados 120 mM tampão Tris-HCl pH 6,8, 4,5 % de acrilamida/bis-acrilamida, 2,3 mL de água, 0,1% de PSA e 10 µL de TEMED. A $H_2O$ ultrapura cada 10 µL de amostras foram adicionados 0,5 µL ditiotreitol (DTT) 1 M e 3 µL tampão de amostra 5X (60 mM de Tris-HCl pH 6,8; 25% de glicerol; 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS); 0,5 mL de β-mercaptoethanol; 0,1% de azul de bromofenol) e 1,5 µL de água, e fervidas a 95°C por 5 minutos. As amostras foram aplicadss no gel e na corrida eletroforética foi utilizado tampão Tris-Glicina 1X (25 mM d Tris; 192 mM de glicina; 3,5 mM de SDS) a 180 V no sistema de

eletroforese de proteína (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) por 30 minutos sob leve agitação e descorado *overnight* com solução contendo 10% de metanol; 10% de ácido acético glacial; 80% de $H_2O$ ultrapura.

### 1.3.9. Concentração e Quantificação das proteínas

As proteínas foram concentradas através de ultrafiltração em membrana usando o Amicon-Ultra 15 mL com corte de 10 kDa NMWL em membrana de celulose regenerada (Merck Millipore, Bellerica, MA, EUA). Após a concentração, as proteínas foram quantificadas a $280_{nm}$ seguindo a lei de Lambert-Beer, onde:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

A é a absorbância; ε é o coeficiente de absortividade molar; l é a distância percorrida pela luz; c é a concentração da substância absorvente pelo meio.

A determinação do coeficiente de absortividade molar foi calculada pelo programa de bioinformática *ProtParam* (https://web.expasy.org/protparam/) de acordo com a sequência primária específica. O valor de ε para as proteoformas mutantes e a enzima selvagem foi de 19.370 $M^{-1}.cm^{-1}$.

### 1.3.10. Espalhamento dinâmico de Luz

A determinação da massa molecular das proteoformas selvagem (WT) e dupla mutante (DM) foram realizadas através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS – do inglês *Dynamic Light Scattering*). Para isso, as enzimas WT (1,3 mg/mL) e DM (1,7 mg/mL) foram centrifugadas a 10.000 x *g* por 10 minutos a 4°C e filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 µM (Merck Millipore, Bellerica, MA, EUA). Em seguida, 20 µL da proteína foi aplicada em cubeta de quartzo para realização da medida. O branco utilizado foi o tampão das amostras, 20 mM de fosfato de potássio pH 8,0 + 100 mM de glicina. Foram realizadas vinte leituras a cada 5 segundos a 25°C. O equipamento utilizado foi o *DynaPro NanoStar* (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, EUA) do Laboratório de Proteínas e Biologia Redox do Instituto de Biociências – USP, e a análise dos dados foi realizada pelo software *DYNAMICS* (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, EUA) a 25°C utilizando o modelo proteína globular.

### 1.3.11. Análise de dicroísmo circular

As enzimas WT e DM depois de purificadas e quantificadas foram submetidas à análise de estrutura secundária por dicroísmo circular. A análise foi realizada usando uma cubeta de 10 mm de trajeto contendo 3 µM de proteína em tampão 20 mM fosfato de potássio pH 8,0 no Centro Analítico do Instituto de Química - IQ - USP (São Paulo, SP, Brasil) em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Inc., Indaiatuba, SP, Brasil), no mesmo dia que as enzimas foram purificadas. Os dados obtidos do dicroísmo circular foram analisados utilizando o software *CDNN 2.1 Circular Dichroism Spectroscopy Deconvolution* (Applied Photophysics Ltd., Leatherhead, Reino Unido).

### 1.3.12. Determinação da Atividade Específica

#### 1.3.12.1. Ensaio colorimétrico

A ASNase catalisa a hidrólise de L-asparagina e L-glutamina em ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente e amônia. Para determinar a atividade enzimática utilizamos o reagente de Nessler, o qual é composto por uma solução de tetraiodomercurato (II) de potássio que detecta nitrogênio amoniacal formando um precipitado amarelo-acastanhado, representado na reação 1.1.

$$NH_3 + 2[HgI4]^{2-} + 3OH^- \rightarrow \downarrow Hg_2O(NH_2)I^- + 7I^- + 2H_2O$$

Reação 1.1 - Reação de detecção de nitrogênio amoniacal utilizando reagente de Nessler.

O ensaio de atividade específica foi realizado em microplacas utilizando 50 mM fosfato de potássio pH 8,0, 20 mM de L-asparagina ou L-glutamina (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) em volume final de 370 µL. A quantidade de enzima variou de 0,065 µg a 1,04 µg de proteína para reação com L-asparagina e, de 1,09 µg a 10,9 µg de proteína para reação com L-glutamina. A reação foi incubada a 37 °C por 10 min e parada com 20 µL de 1,5 M ácido tricloroacético (TCA) (IMADA et al., 1973; PRADHAN et al., 2013). A reação foi diluída 10X em água, adicionado 37 µL de Reagente de Nessler (Merck Millipore, Bellerica, MA, EUA), volume final de 370 µL. A leitura foi realizada a $440_{nm}$ em

espectrofotômetro leitor de microplacas *SpectraMax M2* (Molecular Devices, San José, CA, EUA). A curva padrão foi feita com sulfato de amônio variando a concentração entre 0 e 20 µmol/mL (ORSONNEAU et al., 2004) nas mesmas condições dos ensaios. Para quantificação das reações os valores de absorbância obtidos foram interpolados nessa curva padrão.

O branco do ensaio, contendo todos reagentes com exceção do substrato (L-asparagina ou L-glutamina), e o controle negativo, contendo todos os reagentes com exceção da enzima, foram incubados nas mesmas condições da reação descrita acima. As absorbâncias do branco e do controle negativo foram mensuradas e aquele que apresentou o maior valor foi descontado da reação.

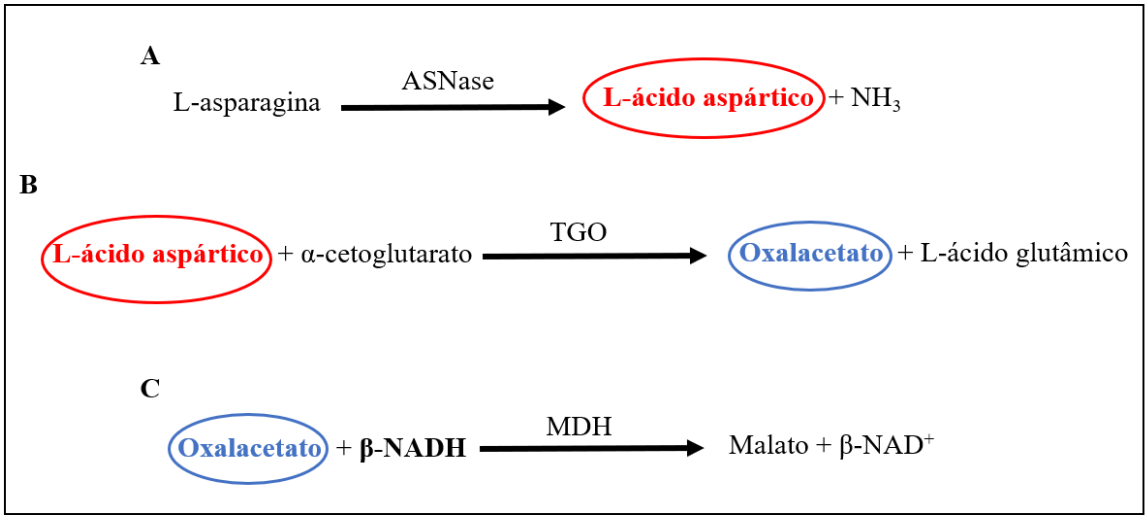
O tempo de reação foi determinado previamente realizando o ensaio de atividade em diferentes tempos para cada concentração de enzima utilizada. Concluiu-se que 10 minutos de reação é o tempo em que todas as concentrações de enzima, nas condições descritas acima, estão na velocidade inicial e consomem menos de 5 % do substrato.

#### 1.3.12.2. Ensaio acoplado

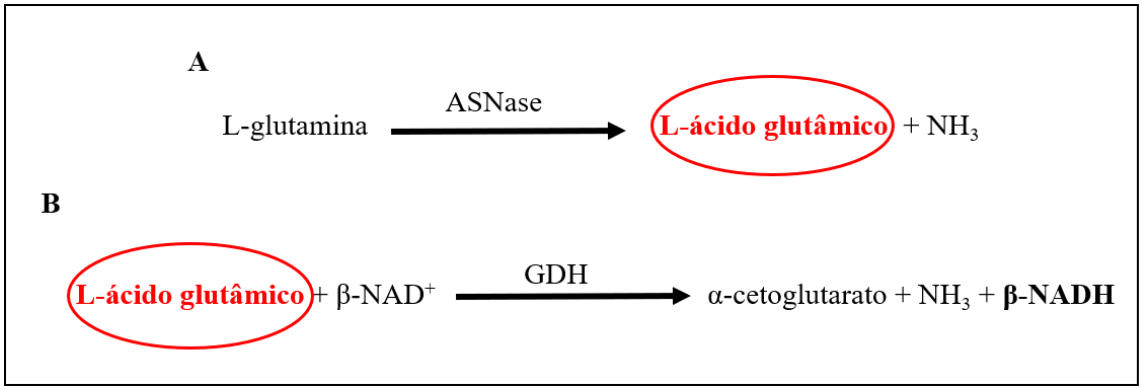
As atividades enzimáticas para L-asparagina e L-glutamina foram determinadas por ensaio acoplado à enzima na presença de β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (β-NADH) para L-asparagina, ou β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo (β-NAD+) para L-glutamina.

Resumidamente, a reação para determinar os parâmetros cinéticos para L-asparagina consistiu em 100 mM de Tris-HCl pH 7,4, 0,4 mM de α-cetoglutarato, 0,4 mM de β-NADH (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA), 5 U/mL de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), 1 U/mL de malato desidrogenase (MDH), 20 mM de L-asparagina e de 0,065 a 0,52 µg de proteína (RIGOUIN et al., 2017), reação 1.2. A reação é estequiométrica, onde 1 mol de L-ácido aspártico produzido pela hidrólise da L-asparagina equivale a 1 mol de β-NADH oxidado a β-$NAD^+$.

Para L-glutamina, foram adicionados 50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 0,05 mg de glutamato desidrogenase (GDH) (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA), 1,2 mM de β-$NAD^+$ (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA), 0,5, 2,0 ou 20 mM de L-glutamina e de 0,26 a 1,0 µg de proteína (COSTA et al., 2016), reação 1.3. A reação é estequiométrica, onde 1 mol de L-ácido glutâmico produzido pela hidrólise de L-glutamina equivale a 1 mol de β-$NAD^+$ reduzido a β-NADH.




Reação 1.2 - Representação das três reações enzimáticas do ensaio acoplado a β-NADH para determinação dos parâmetros cinéticos da ASNase usando L-asparagina como substrato. Reação A - hidrólise da L-asparagina catalisada pela ASNase, em vermelho está destacado o produto da hidrólise utilizado na próxima etapa; Reação B - Síntese de oxalacetato catalisada pela enzima transaminase glutâmico oxalacética (TGO), em azul está destacado o produto da hidrólise utilizado na terceira etapa; Reação C – Síntese de malato catalisada pela enzima malato desidrogenase (MDH) utilizando β-NADH (em negrito) como cofator. A oxidação de β-NADH a β-$NAD^+$ é acompanhada em tempo real a 340 nm.




Reação 1.3 - Representação das duas reações enzimáticas do ensaio acoplado a β-NAD+ para determinação dos parâmetros cinéticos da L-asparaginase (ASNase) usando L-glutamina como substrato. Reação A - hidrólise da L-asparagina catalisada pela ASNase, em vermelho está destacado o produto da hidrólise utilizado na próxima etapa; Reação B - Síntese de α-cetoglutarato catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (GDH) utilizando o L-ácido glutâmico como substrato e o β-$NAD^+$ como cofator. A redução de a β-$NAD^+$ a β-NADH (em negrito) é acompanhada em tempo real a 340 nm.

Ambas reações foram iniciadas com a adição do substrato e monitorada a 37°C a 340 nm. Como controle negativo a reação foi realizada sem a presença de ASNase e o branco da reação foi monitorado durante o mesmo tempo de reação sem a adição de β-NADH ou β-$NAD^+$. A oxidação de β-NADH a β-$NAD^+$ e a redução de β-$NAD^+$ a β-NADH foram monitoradas em tempo real a 340nm em um espectrofotômetro leitor de microplacas *SpectraMax M2* (Molecular Devices, San José, CA, EUA); o coeficiente de extinção molar utilizado foi de 6,22 $mM^{-1}.cm^{-1}$.

### 1.3.13. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados através do ensaio acoplado às enzimas TGO e MDH para L-asparagina, ou à enzima GDH para L-glutamina. Foram utilizadas as mesmas condições descritas para atividade específica descrita no item 1.3.12.2, com exceção das concentrações de proteína ASNase e de substrato. Para L-asparagina, foi utilizado 5 nM de proteína para enzima WT e 2,5 nM para DM com as concentrações de substrato variando de 3,9 µM a 500 µM. Para L-glutamina, foi utilizado 50 nM de cada enzima e a concentração de substrato variou de 0,039 mM a 10 mM.

O cálculo dos parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten ($K_m$), velocidade máxima ($V_{máx}$), constante catalítica ($k_{cat}$) e eficiência catalítica ($k_{cat}$/ $K_m$) foi realizado com o auxílio do programa *GraphPad Prism*® 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) utilizando regressão não linear, a partir da velocidade inicial ($V_0$) de hidrólise para cada concentração de substrato.

### 1.3.14. Determinação do pH ótimo e temperatura ótima

Para determinação do pH ótimo o mesmo ensaio de atividade específica descrito no item 1.3.12.1 foi realizado a 37°C com diferentes tampões: 50 mM ácido cítrico pH 4,0 e 5,0; 50 mM fosfato de potássio pH 6,0, 7,0 e 8,0; 50 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM Bicarbonato de sódio pH 10,0 e 11,0. Em cada reação foi adicionado 500 mM de NaCl para diminuir a interferência da força iônica dos diferentes tampões.

Para determinar a temperatura ótima, o mesmo ensaio de atividade específica foi realizado em diferentes temperaturas de 15°C a 65°C com intervalos de 5°C, utilizando tampão 50 mM de fosfato de potássio pH 8.0.

### 1.3.15. Estabilidade na presença de soro humano *in vitro*

As enzimas foram incubadas com 10 % de soro humano (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) a 37 °C em banho de água por seis dias. Como controle, incubamos as enzimas sem adição de soro nas mesmas condições e, o branco do ensaio foi feito sem a presença das enzimas. A cada 24 horas, foi realizado o ensaio de atividade específica descrito no item 1.3.12.1.

### 1.3.16. Avalição da resistência proteolítica

As enzimas ASNase foram incubadas durante 24 horas a 37°C na presença de catepsina B (CTSB) e asparaginil endopeptidase (AEP) humanas, de acordo com protocolo adaptado de Patel (2009). No ensaio foram utilizados 1 µL de CTSB 1.500 U/mg (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) ou AEP 0,4 mg/mL (Abcam Plc, Cambridge, Reino Unido), 2 µg das enzimas ASNase WT ou DM, 50 mM de tampão citrato de sódio pH 5,2. Após as 24 horas a 37°C, a ação proteolítica foi avaliada por gel SDS-PAGE como descrito no item 1.3.8.

### 1.3.17. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

O anticorpo anti-ASNase primário utilizado foi produzido sob encomenda em coelho contra enzima selvagem de *D. chrysanthemi* pela empresa Rheabiotech (Campinas, SP, Brasil). A placa de ELISA de alta ligação (Greiner Bio-One, Americana, SP, Brasil) foi imobilizada com 0,001 ng a 1,0 ng de proteína (WT ou DM) diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X *overnight* a 4°C. Após imobilização, a placa foi lavada com PBS 1X e 0,5% de Tween-20 (PBS-T 1X) para remoção das enzimas não ligadas; em seguida, a placa foi bloqueada com 1% de BSA diluída em PBS 1X e incubada por 90 minutos a 37°C sob agitação a 150 r.p.m. O sobrenadante foi descartado e a placa foi lavada novamente com PBS-T 1X. O anticorpo anti-ASNase (1:10.000 v/v) diluído em solução de trabalho (PBS 1X, 10% de soro fetal bovino e 0,2% de Tween-20) foi adicionado e a placa foi incubada por 90 minutos a 37°C sob agitação a 150 r.p.m. A placa foi lavada com PBS-T 1X e o anticorpo IgG anti-coelho secundário conjugado com peroxidase – *KPL antibodies* (LGC SaraCare, Milford, MA, EUA) (1:3.000 (v/v) diluído em solução de trabalho) foi adicionado à placa e incubado em temperatura ambiente por 90 minutos e, em seguida, o anticorpo não ligado foi removido com uma única lavagem com PBS 1X. Após a lavagem, foram adicionados 100 µL de uma solução contendo 1% de dicloridrato de *o*-fenilenodiamina (OPD) (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) (p/v) e 0,1% $H_2O_2$ 30% (Synth, São Paulo, SP, Brasil) (v/v) diluídos em tampão 50 mM citrato-fosfato pH 5,3; após 5 minutos foram adicionados 100 µL de ácido sulfúrico 2 M (Synth, São Paulo, SP, Brasil) para parar a reação. A absorbância foi medida a 492 nm em um espectrofotômetro leitor de placa *SpectraMax M2* (Molecular Devices, San José, CA, EUA).

### 1.3.18. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

No ensaio foram utilizadas as linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda MOLT-4 e REH, obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram cultivadas a 37°C com 5% de $CO_2$ em meio RPMI-1640 (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) e suplementado com 10 mM HEPES, 1 mM piruvato e 4,5 g/L de glicose.

Em microplaca de 96 poços foram adicionados 2 X $10^4$ células (MOLT-4 ou REH) em 150 µL de meio de cultivo (RPMI-1640 + 10% SFB) suplementado e seis concentrações da enzima WT ou DM (0,01, 0,05, 0,1, 0,3, 0,5 e 1 U/mL); a placa foi incubada a 37°C com 5% de $CO_2$ por 72 horas. Após a incubação, foi adicionado 0,5 mg/mL de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) diluído em PBS 1X e a placa foi incubada a 37°C com 5% de $CO_2$ por 3 horas. Em seguida, 150 µL de uma solução contendo 10% SDS + 0,01M de HCl foram adicionados na placa e incubada a 37°C com 5% de $CO_2$ *overnight* para solubilização dos cristais. Após a solubilização, a absorbância foi medida a 597 nm em espectrofotômetro leitor de placas *SpectraMax M2* (Molecular Devices, San José, CA, EUA).

## 1.4.RESULTADOS

### 1.4.1. Seleção das proteoformas mutantes

#### 1.4.1.1. Expressão e purificação das proteoformas mutantes

Dez dos dezessete clones obtidos pela biblioteca de mutantes previamente criada pelo nosso grupo de pesquisa foram reanalisados nesse trabalho. Os dez clones listados na tabela 1.1 foram cultivados em meio LB + carb, submetidos a extração plasmidial e confirmados por gel de agarose (figura 1.3A), o tamanho esperado da construção pET-15b + *ansB* de *D. chrysanthemi* é de aproximadamente 7.000 pb. As bandas por volta de 5.000 pb representam os plasmídeos em estado *supercoil*.

A presença do inserto *ansB* foi confirmada por PCR (figura 1.3B) apresentando bandas entre 1.000 e 1.650 pb. O gene *ansB* de *D. chrysanthemi* possui 1.044 pb e os

iniciadores utilizados (que correspondem às regiões do promotor e terminador T7 do vetor que flanqueiam o gene) possuem aproximadamente 300 pb de distância entre si; portanto, na confirmação do inserto são esperadas bandas de aproximadamente 1.350 pb. Após a confirmação, os plasmídeos foram inseridos em linhagens de *E. coli* DH5α para estoque e enviados para sequenciamento no Serviço de Sequenciamento de DNA do Instituto de Química – IQ/USP para garantir a utilização dos clones corretos. Após a confirmação das sequências corretas os plasmídeos foram retransformados em *E. coli BL21(DE3)* para expressão proteica.

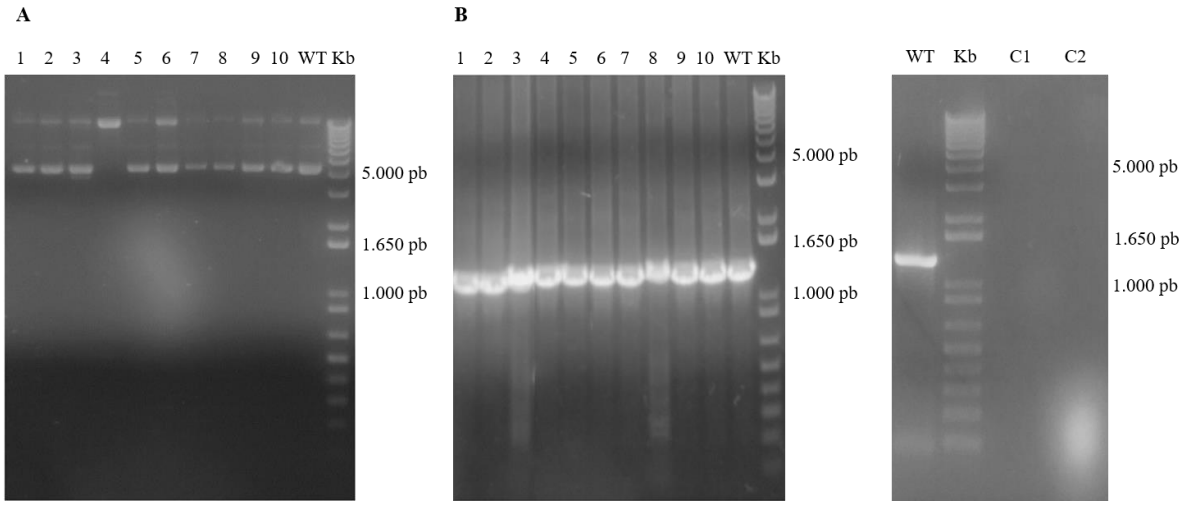



Figura 1.4.3 - Confirmação da obtenção dos plasmídeos e confirmação da presença de inserto por gel de agarose 1%. A - Extração plasmidial dos dez diferentes clones mutantes e o clone selvagem (WT). B - PCR dos dez diferentes plasmídeos com mutação e do plasmídeo com o gene *ansB* selvagem (WT), com aproximadamente 1.350 pb, utilizando os iniciadores do promotor e terminador T7 do vetor pET1-5b, o quais flanqueiam o gene de interesse para confirmação de inserto; C1 é o controle da reação de PCR sem os iniciadores; C2 é o controle da reação de PCR sem o DNA; Kb representa o padrão utilizado *1Kb DNA ladder* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA).

Após a expressão das dez proteoformas e da enzima selavagem, os *pellets* celulares obtidos foram submetidos ao procedimento de choque osmótico, onde somente a parede celular externa da bactéria é rompida, e as proteínas secretadas para o periplasma são obtidas (HARMS et al., 1991).

Pela análise do ponto isoelétrico das proteínas, escolhemos a coluna de troca catiônica *HiTrap® SP FF* (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EUA) para purificação. Essa coluna realiza a troca de cátions, portanto ao submeter a proteína a um pH abaixo do seu ponto isoelétrico a proteína passa a ter carga líquida positiva, sendo possível a realização da troca catiônica. Todas as proteoformas mutantes e a enzima WT foram purificadas com três etapas de pH, o que possibilitou a obtenção das proteínas com elevado grau de pureza, confirmadas por eletroforese em SDS-PAGE (figura 1.4).

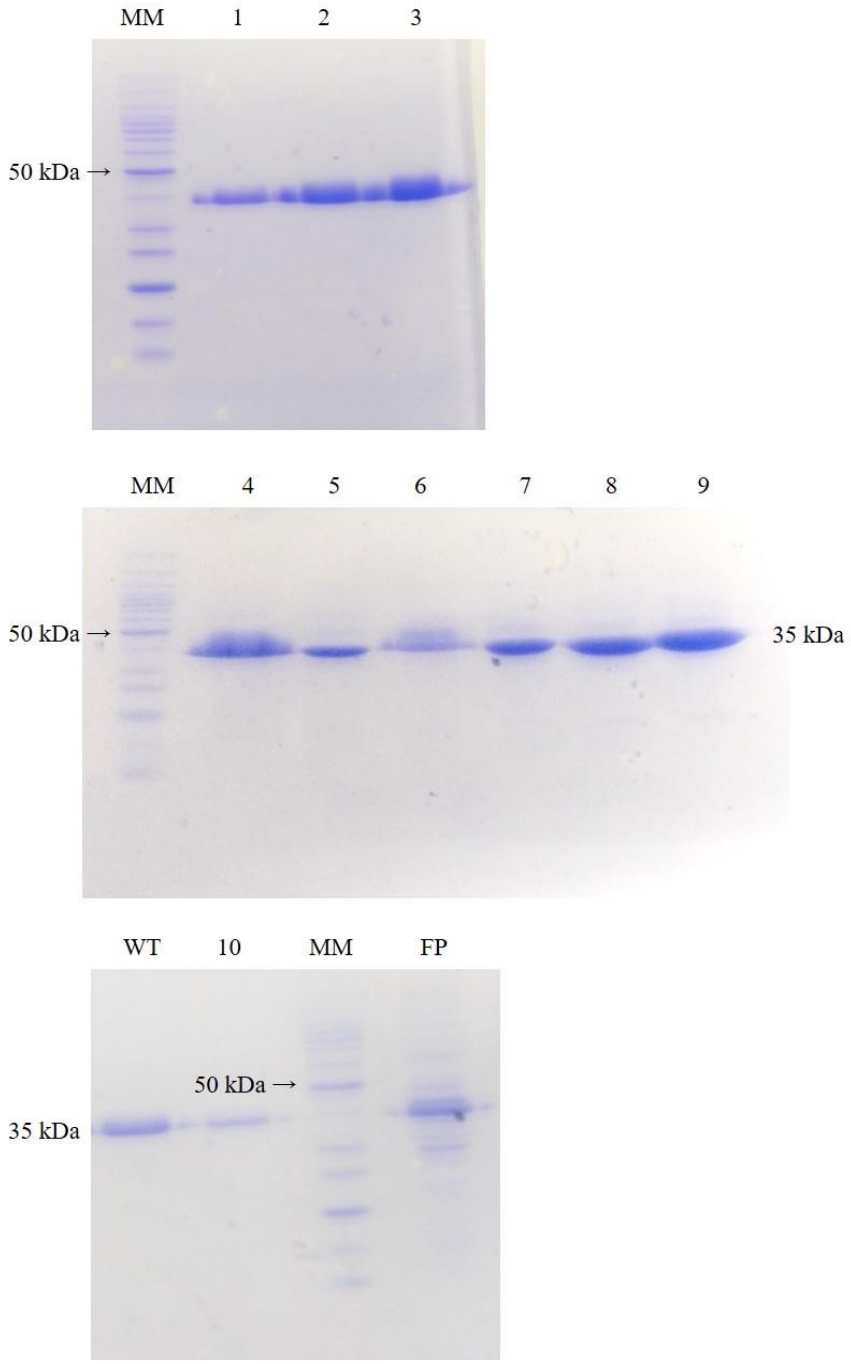



Figura 1.4 - Gel SDS-PAGE 14% para confirmação da purificação das dez proteoformas mutantes (1 a 10) e selvagem (WT) da enzima ASNase de *D. chrysanthemi*. FP é fração periplasmática da bactéria que expressa a enzima WT antes da purificação; em cada canaleta foram aplicados 10 µL de proteínas previamente purificadas. Todas as proteínas possuem massa molecular de aproximadamente 35 kDa; MM indica o padrão de massa molecular *BenchMark* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA).

#### 1.4.1.2. Determinação da atividade específica das dez proteoformas

Em busca de uma enzima com características superiores às enzimas disponíveis no mercado, com potencial para reduzir os possíveis efeitos adversos e melhorar a eficácia do tratamento, utilizamos como parâmetro de seleção a melhoria na atividade específica para L-

asparagina e L-glutamina. Desta forma, as proteoformas mutantes puras foram quantificadas e em seguida as atividades específicas para L-asparagina e L-glutamina foram determinadas e comparadas com a enzima WT. Para isso, a concentração de substrato foi mantida fixa em excesso e as concentrações de proteínas foram variadas.

Após a incubação com o substrato (L-asparagina ou L-glutamina), as absorbâncias foram substituídas na equação da reta, obtida através da curva de calibração para o reagente de Nessler, feita com sulfato de amônio (anexo B). Desta forma, foi possível calcular a concentração de amônia produzida durante a hidrólise catalisada por cada concentração das enzimas. Os valores encontrados foram divididos pelo tempo de reação e, assim, foi determinada a velocidade de formação de produto em μmol/min.

A atividade específica da enzima é dada pela velocidade da reação em função da quantidade em miligrama de proteína utilizada no ensaio. O coeficiente angular da equação da reta corresponde a atividade específica (U/mg), sendo que, uma unidade (U) equivale a um μmol de $NH_3$ produzido por minuto pela enzima a 37°C. Em resumo, todos os valores calculados para cada proteoforma estão relacionados na tabela 1.2, e os gráficos de todas as reações estão apresentados no anexo B para a atividade asparaginásica (ASNase) e no anexo C para a atividade glutaminásica (GLNase).

Tabela 1.2 - Atividade específica das proteoformas mutantes de ASNase

| **Proteoforma** | **L-asparagina (U/mg)** | **L-glutamina (U/mg)** | **GLNase / ASNase %** |
|---|---|---|---|
| WT | 325,5 ± 7,7 | 49,2 ± 2,2 | 15,1 |
| 1 | 194,9 ± 8,6 | 24,0 ± 0,8 | 12,3 |
| 2 | 159,7 ± 6,7 | 23,0 ± 0,8 | 14,4 |
| 3 | 145,8 ± 5,3 | 25,3 ± 1,2 | 17,3 |
| 4 | 83,0 ± 4,5 | 5,3 ± 0.3 | 6,4 |
| 5 | 109,1 ± 2,7 | 11,8 ± 0,4 | 10,8 |
| **6** | **468,4 ± 7,9** | **43,0 ± 1,8** | **9,2** |
| 7 | 280,0 ± 6,9 | 44,7 ± 1,2 | 15,9 |
| 8 | 342,5 ± 29,9 | 57,9 ± 1,0 | 16,9 |
| 9 | 240,0 ± 6,2 | 35,0 ± 1,5 | 14,6 |
| 10 | 164,7 ± 7,8 | 30,6 ± 1,1 | 18,5 |

Atividade específica mensurada por reagente de Nessler para L-asparagina e L-glutamina em U/mg e a razão entre ambas (GLNase /ASNase) calculada em %.

Diante dos resultados obtidos após o ensaio de atividade com as proteoformas puras, produzidas e purificadas nas mesmas condições que a enzima WT, nós selecionamos a proteoforma número 6 para continuidade do estudo de caracterização por apresentar um aumento significativo na atividade asparaginásica e sem alterações significativas na atividade glutaminásica quando comparada com a enzima WT. A proteoforma 6 é 44 % mais ativa para L-asparagina do que a enzima WT, e a sua relação GLNase / ASNase é 40 % inferior à da enzima WT (tabela 1.2).

### 1.4.2. Caracterização da proteoforma selecionada

#### 1.4.2.1. Avaliação das mutações, pureza, estrutura secundária e quaternária da proteína

Após a seleção da proteoforma 6, a presença de duas mutações foi confirmada por meio do sequenciamento de DNA: uma mutação interna na interface de dois monômeros e próxima a resíduos do sítio ativo da enzima, uma glutamina na posição 227 por um ácido glutâmico (Q227E); e uma mutação na superfície, uma valina na posição 272 por uma metionina (V272M). A posição das mutações foi identificada considerando a sequência da proteína madura (sem os 21 aminoácidos da sequência sinalizadora para o periplasma), como mostra a figura 1.5. Por isso, nos próximos resultados apresentados a proteoforma 6 será denominada dupla mutante (DM).

A enzima WT e a proteoforma DM passaram ser cultivadas em volume de 1 L para obtenção de maiores quantidade de proteína para realização dos ensaios de caracterização. Após realizar a troca catiônica do extrato periplasmático obtido a partir de 1 L de cultivo, confirmamos a eficiência da purificação por SDS-PAGE e por cromatografia de exclusão molecular (figuras 1.6A e B). O cromatograma de exclusão molecular mostra a presença de um único pico, de alta resolução e com o mesmo tempo de retenção de 13,68 mL para ambas enzimas, confirmando a obtenção das enzimas com elevado grau de pureza por um único passo cromatográfico e sem alterações na conformação da enzima após a dupla mutação em relação a enzima WT.

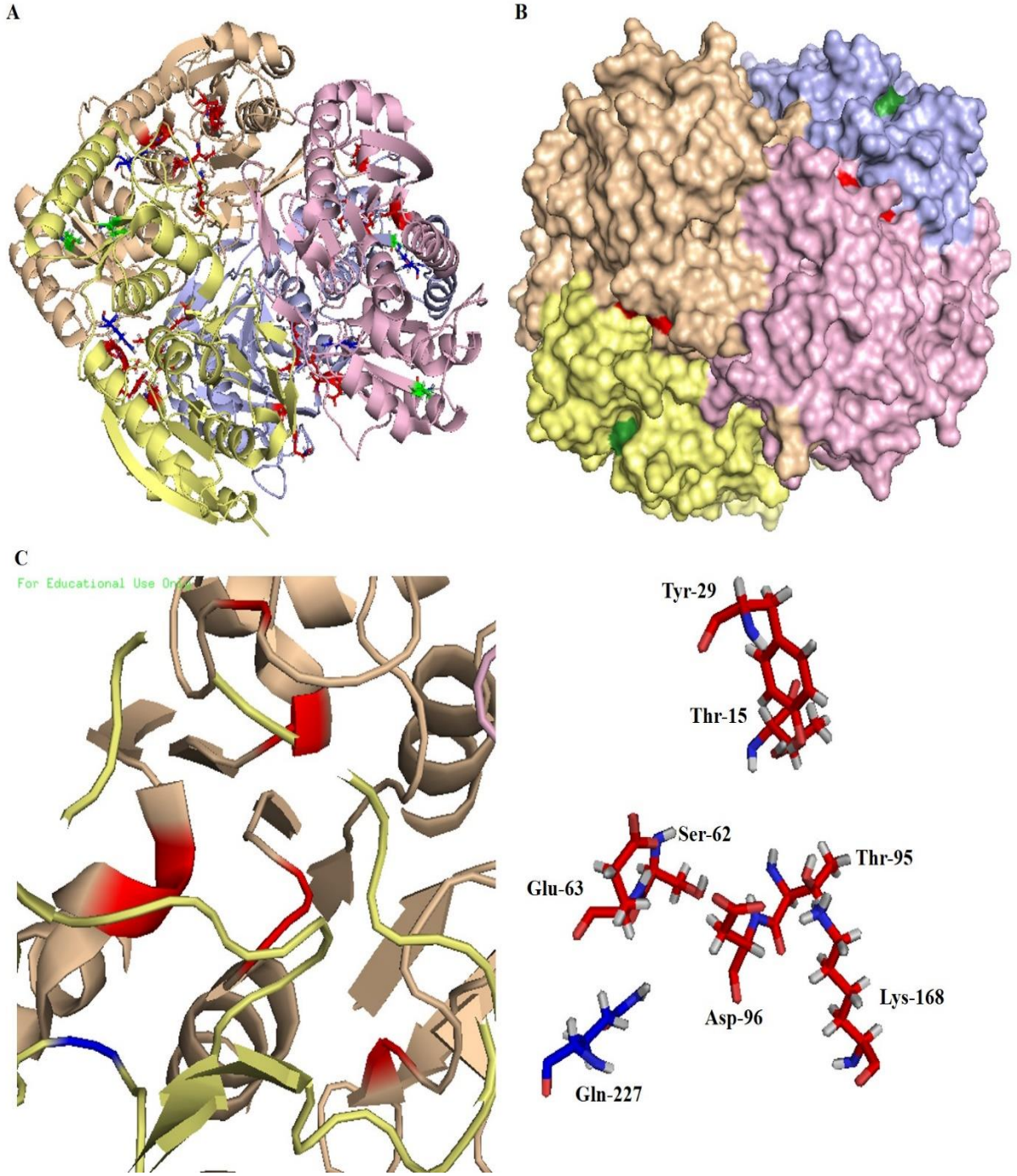



Figura 1.5 - Identificação dos resíduos mutados na ASNase de *D. chrysanthemi* proteoforma 6. Representação do modelo do tetrâmero da enzima em cartoon (A). Em verde está o resíduo valina 272 mutado por uma metionina, localizado na superfície da proteína (B), em vermelho está representado os resíduos do sítio ativo, e em azul está o resíduo de glutamina na posição 227 que foi mutado por um ácido glutâmico, localizado na interface de dois monômeros (C). Figura criada pelo programa PyMOL utilizando a estrutura 1OJ7 obtida do *Protein Data Bank* (PDB) com as referidas substituições nos aminoácidos que sofreram mutação na estrutura primária.

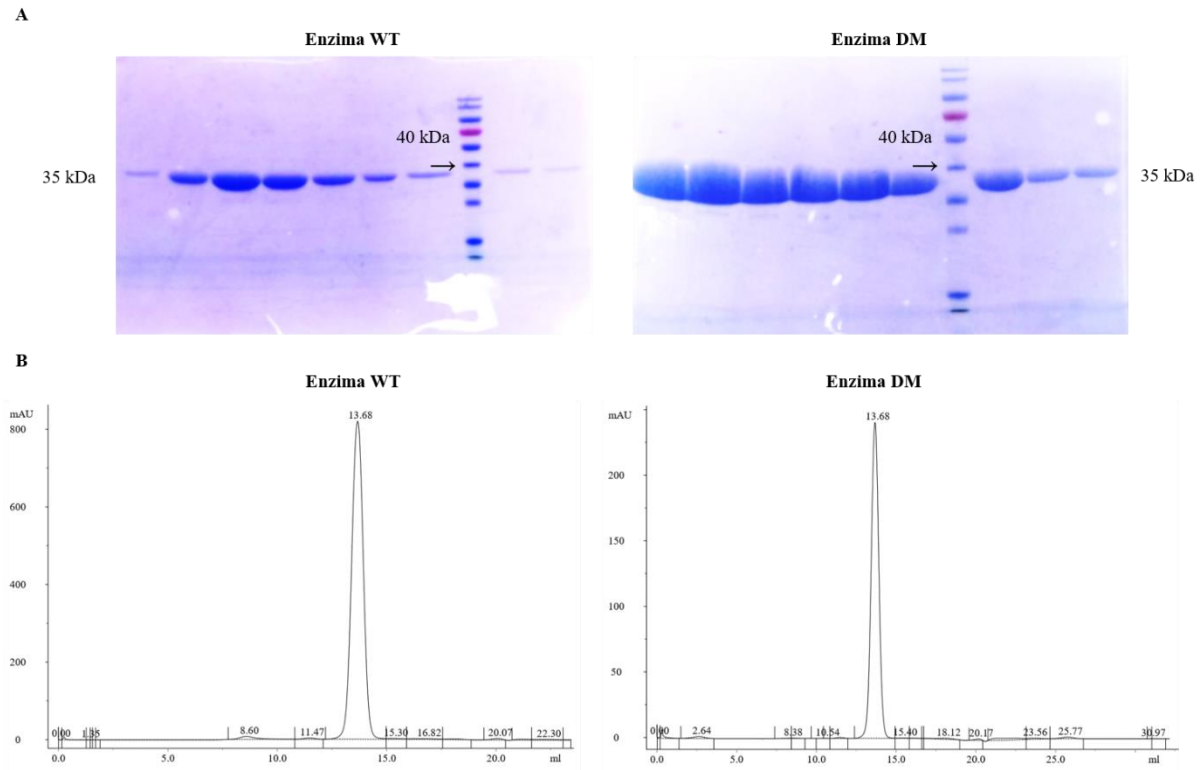



Figura 1.6 - Avaliação do grau de purificação e conformação das proteínas. A- Gel SDS-PAGE 14% para confirmação da purificação das enzimas selvagem (WT) e dupla mutante (DM) após troca catiônica do extrato periplasmático. No gel foi aplicado 10 µL de diferentes frações da proteína coletada durante a eluição com 50 mM de fosfato de potássio pH 8,0. As proteínas possuem massa molecular de aproximadamente 35 kDa; o padrão de massa molecular utilizado foi o *Prestained Dual Color Molecular Weight Marker* 10-170 kDa (MyBioSource, San Diego, CA, EUA). B- Exclusão molecular das frações coletadas após troca catiônica das enzimas WT e DM. As frações purificadas utilizando a coluna de exclusão molecular *Superdex® 200 Increase 10/300 GL* (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EUA).

Por seguinte, avaliamos possíveis alterações na estrutura secundária e quaternária da proteína. Primeiro, utilizamos a técnica de espalhamento dinâmico de luz para verificar se, após o processo de extração e purificação, ambas enzimas estavam com o grau de oligomerização esperado formando um tetrâmero de aproximadamente 140 kDa. Em seguida, por meio do espectro de dicroísmo circular analisamos a estrutura secundária da proteína DM e comparamos com a enzima WT.

A análise de DLS mostrou que ambas enzimas obtiveram tamanhos semelhantes, indicativo de que estão na conformação tetramérica com massa molecular de aproximadamente 140 kDa (tabela 1.3). A enzima WT apresentou alguns contaminantes na amostra, os quais podem ter influenciado a determinação do tamanho da proteína, estimado em 162 kDa. Já a enzima DM apresentou um menor número de contaminantes e um perfil menos polidisperso do que a WT e seu tamanho estimado de 134 kDa foi o mais próximo do esperado (figura 1.7).

Tabela 1.3 – Análise de DLS das enzimas WT e DM

| Enzima | Intensidade (Cnt/s) | Raio (nm) | %PD | Mw-R (kDa) | Amplitude | SOS |
|---|---|---|---|---|---|---|
| WT | 17856,025 | 5,237 | 53,7 | 162 | 0,528 | 43,538 |
| DM | 264336,586 | 4,832 | 37,4 | 134 | 0,487 | 22,629 |

Os dados são a média de 20 leituras feitas a 25 °C.
Cnt/s – *counts/sec* (contagem por segundo);
PD – Polidispersão;
Mw-R – *Molecular weight-Radius* (massa molar média estimada a partir do raio hidrodinâmico);
SOS – *Sum of squares* (estatística de erro da soma dos quadrados);

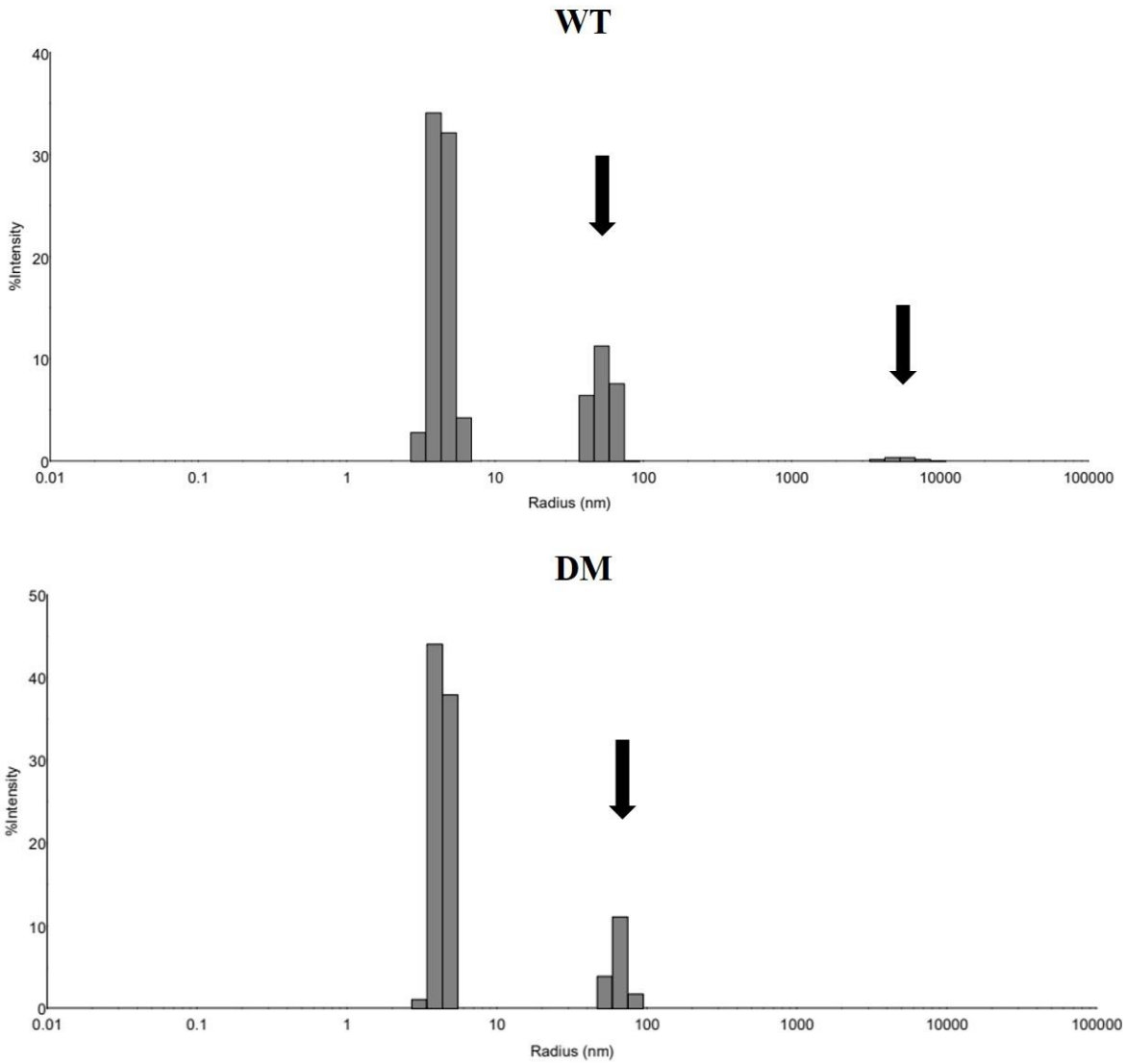
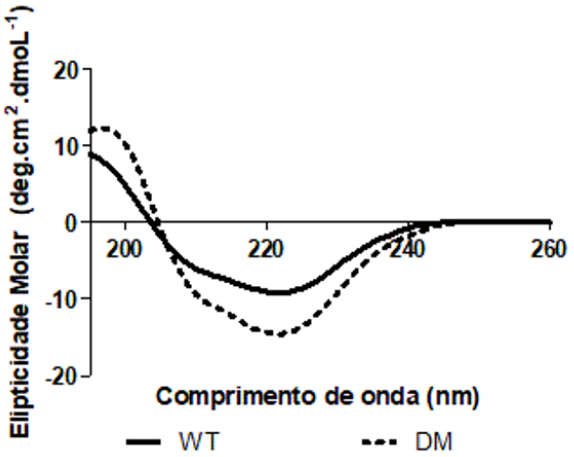



Figura 1.7 - Análise do grau de oligomerização da enzima DM em comparação com a WT por espalhamento dinâmico de luz (DLS). As setas indicam a presença de contaminantes.

A estrutura quaternária da enzima DM não foi alterada pelas mutações, porém a presença da dupla mutação alterou a estrutura secundária da proteína (figura 1.8). A análise do dicroísmo circular mostrou um aumento de estrutura em α-hélices e redução da quantidade de folhas-β na proteoforma DM.




| Estrutura | WT | DM |
|---|---|---|
| α-hélice | 23,8% | 31,1% |
| *β-sheet* antiparalela | 14,9% | 9,2% |
| *β-sheet* paralela | 12% | 10,2% |
| *β-turn* | 18,4% | 16,8% |
| *Random coil* | 41,7% | 39,4% |

Figura 1.8– Espectro do dicroísmo circular das proteoformas WT e DM e quadro relacionando a porcentagem das estruturas secundárias. O ensaio foi realizado pelo serviço da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) em duplicata no mesmo dia em que as amostras foram purificadas. A análise dos dados foi feita com o software CDNN (*Circular Dichroism analysis using Neural Networks*).

#### 1.4.2.2. Determinação da atividade específica e parâmetros cinéticos para L-asparagina

Após a obtenção das proteínas em maior volume e confirmação do grau de pureza após a purificação, a confirmação do aumento na atividade específica da proteoforma DM para L-asparagina foi realizado utilizando novamente o ensaio colorimétrico com reagente de Nessler e o ensaio acoplado β-NADH. O ensaio acoplado também foi utilizado para determinação dos parâmetros cinéticos, dessa forma anulamos diferença de sensibilidade dos dois métodos, e validamos por uma segunda metodologia a diferença observada na atividade específica entre as enzimas WT e DM.

A figura 1.9A mostra que a atividade asparaginásica da proteoforma DM foi aumentada em 56% em relação a enzima WT utilizando o reagente de Nessler, com 446 U/mg e 285 U/mg respectivamente. Com o ensaio acoplado esse o aumento foi de 46%, 321 U/mg da enzima DM e 219 U/mg da enzima WT. Os parâmetros cinéticos das enzimas WT e DM foram determinados através do modelo de Michaelis-Menten (figura 1.9B). Para a enzima

DM foi utilizado metade da concentração enzimática usada para a enzima WT, pois utilizando a mesma concentração enzimática nos pontos com maior concentração de substrato não foi possível determinar a velocidade inicial, o que está de acordo com a maior atividade específica observada. Os resultados mostram que ambas as enzimas apresentaram a mesma afinidade pelo substrato, com um $K_m$ de aproximadamente 40 µM; porém, o $k_{cat}$ da enzima DM foi aumentado em 30% (tabela 1.4).

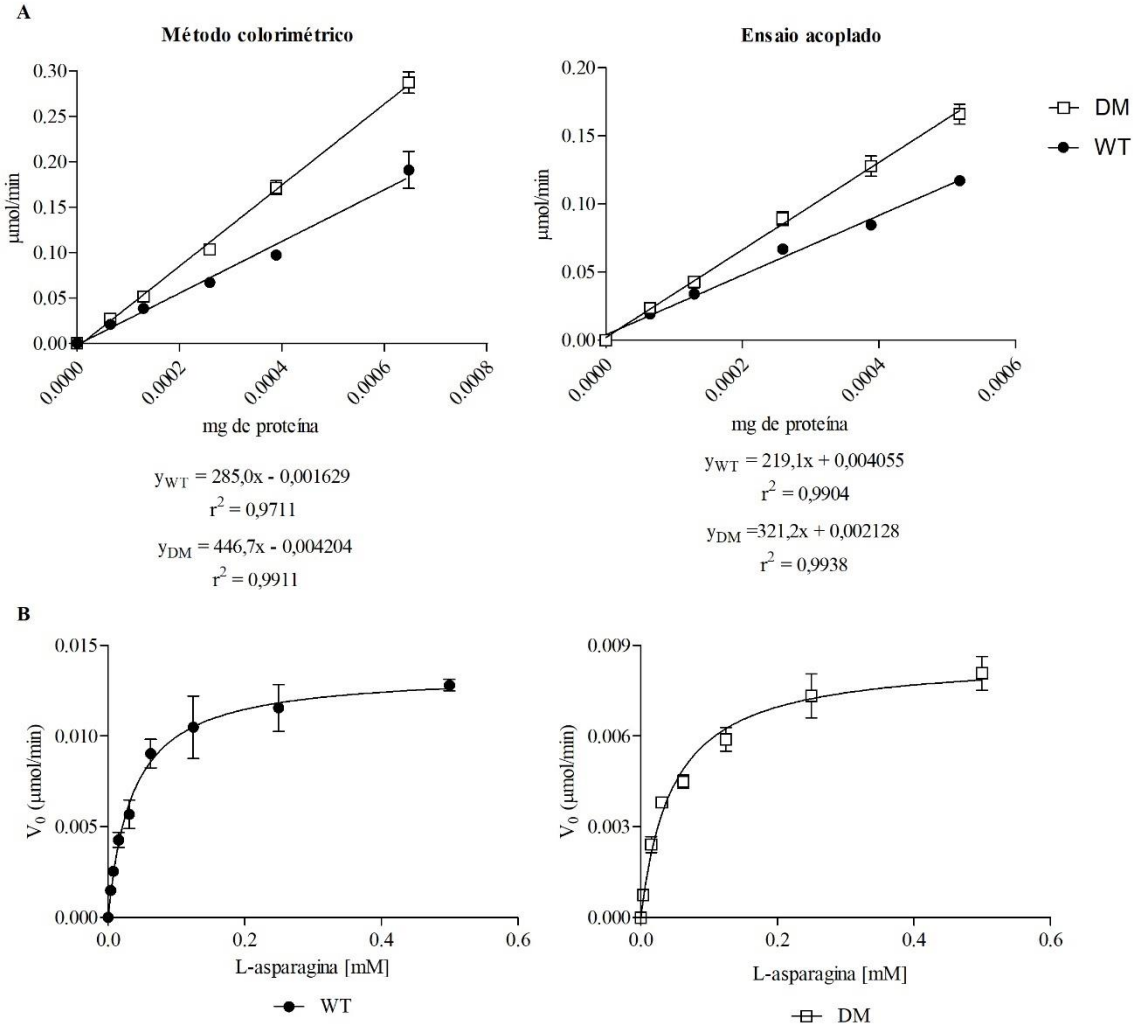



Figura 1.9 – Determinação da atividade específica e parâmetros cinéticos para L-asparagina da proteoforma DM e enzima selvagem (WT). A – Atividade específica determinada pelo ensaio colorimétrico com reagente de Nessler e pelo ensaio acoplado ao β-NADH. Gráfico da velocidade em µmol/min em função da quantidade em miligrama de proteína, onde o coeficiente angular da equação da reta representa a atividade específica para cada enzima dada em U/mg. B - Gráficos de Michaelis-Menten da cinética enzimática utilizando ensaio acoplado ao β-NADH. A comparação entre os modelos de Michaelis-Menten (H0) e Alostérico Sigmoidal (H1) utilizando o teste F mostra que o melhor modelo para os dados das enzimas WT e DM é o modelo de Michaelis-Menten, com $P > 0,05$. Os gráficos foram obtidos por meio do programa GraphPad Prism 5.0. Os ensaios foram realizados em triplicata e representados pela média ± erro padrão.

Tabela 1.4 – Parâmetros cinéticos das enzimas ASNase WT e DM para L-asparagina

| **Enzima** | $K_m$ **(µM)** | $k_{cat}$ **($s^{-1}$)** | $k_{cat}/K_m$ **($M^{-1}/s^{-1}$)** |
|---|---|---|---|
| WT | 35,9 ± 6,3 | 121,8 ± 3,7 | 3,4 x $10^6$ |
| DM | 46,8 ± 7,1 | 154,1 ± 3,9** | 3,3 x $10^6$ |

Teste t comparando os valores de cada parâmetro entre as enzimas WT e DM (**$P$ < 0,05).
Os valores representam a média ± erro padrão da triplicata experimental.
Os parâmetros foram calculados usando o programa GraphPad Prism 5.0.

#### 1.4.2.3. Determinação da atividade específica e parâmetros cinéticos para L-glutamina

A atividade glutaminásica também foi avaliada por dois métodos diferentes: o método colorimétrico com reagente de Nessler e o ensaio acoplado ensaio acoplado a β-$NAD^+$ com a enzima glutamato desidrogenase (GDH), a qual utiliza o β-$NAD^+$ como cofator para produção de α-cetoglutaratoN. Na reação acompanhamos a redução de β-$NAD^+$ a β-NADH a 340 nm.

Como mostra a figura 1.10A, a determinação da atividade glutaminásica utilizando 20 mM de L-glutamina (condição saturante) não mostrou diferença significativa entre as enzimas WT e DM em ambos os métodos utilizados. No entanto, seguindo com a determinação dos parâmetros cinéticos (figura 1.10B), utilizando o ensaio acoplado, observamos que a enzima DM apresenta menor afinidade pelo substrato, com um aumento no $K_m$ de aproximadamente 2 vezes, e redução do $k_{cat}$ de aproximadamente 1,6 vezes menor do que a enzima WT (tabela 1.5).

Devido a diferença de afinidade pelo substrato L-glutamina apresentada pela enzima DM, investigamos se haveriam alterações na atividade específica da enzima em baixas concentrações de substrato, uma vez que não observamos diferenças em concentração saturante de substrato. Para isso, avaliamos a atividade glutaminásica nas concentrações de 2 mM e 0,5 mM de L-glutamina, equivalente as concentrações desse aminoácido nos ensaios *in vitro* e na corrente sanguínea, respectivamente.

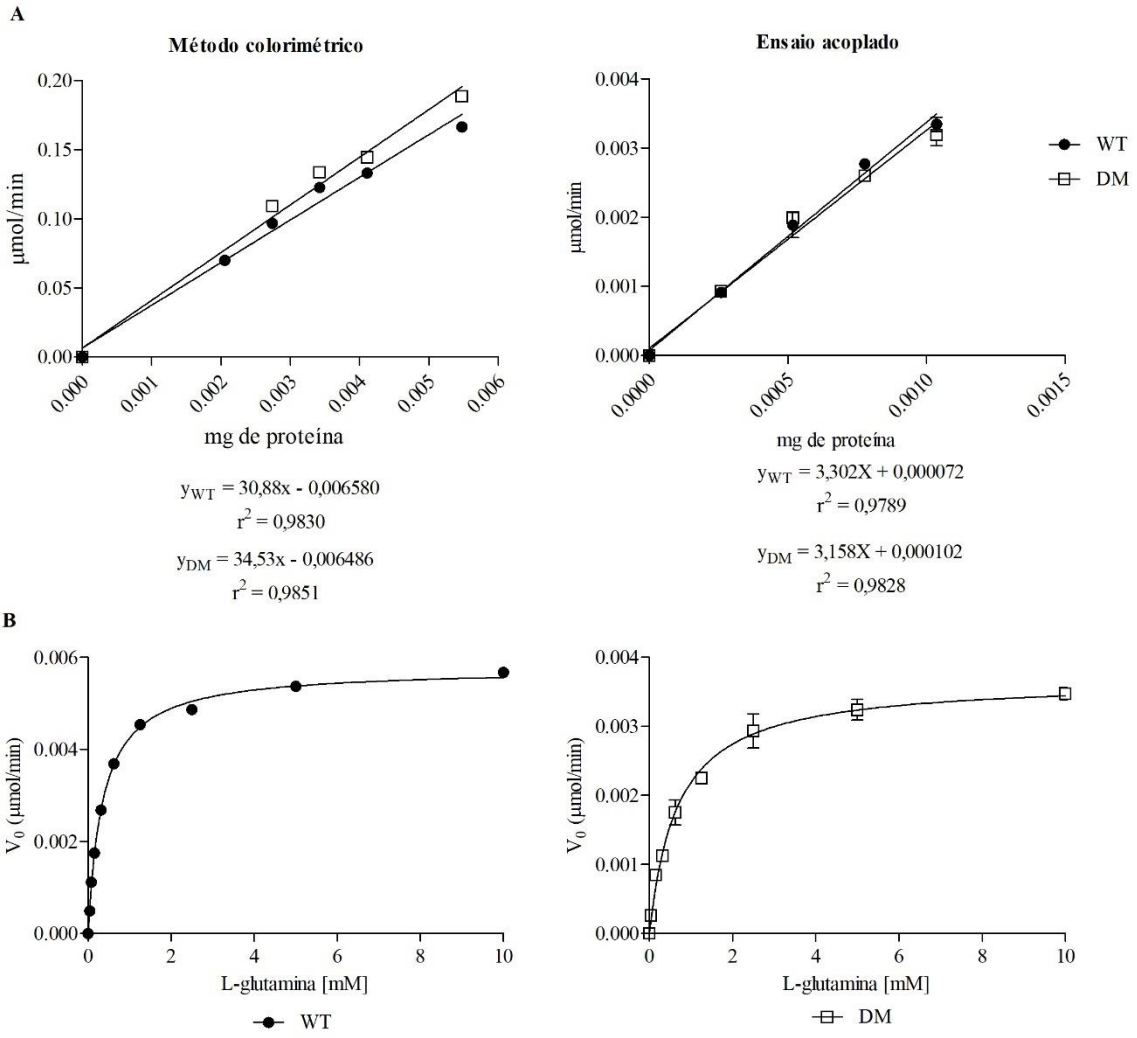



Figura 1.10 – Determinação da atividade específica e parâmetros cinéticos para L-glutamina da proteoforma DM e enzima selvagem (WT). A – Atividade específica determinada pelo ensaio colorimétrico com reagente de Nessler e pelo ensaio acoplado ao β-$NAD^+$ com 20 mM de L-glutamina. Gráfico da velocidade em µmol/min em função da quantidade em miligrama de proteína, onde o coeficiente angular da equação da reta representa a atividade específica para cada enzima dada em U/mg. B - Gráficos de Michaelis-Menten da cinética enzimática utilizando ensaio acoplado ao β-$NAD^+$. A comparação entre os modelos de Michaelis-Menten (H0) e Alostérico Sigmoidal (H1) utilizando o teste F mostra que o melhor modelo para os dados das enzimas WT e DM é o modelo de Michaelis-Menten, com $P > 0,05$. Os gráficos foram obtidos por meio do programa GraphPad Prism 5.0. Os ensaios foram realizados em triplicata e representados pela média ± erro padrão.

Tabela 1.5 – Parâmetros cinéticos das enzimas WT e DM para L-glutamina

| **Enzima** | $K_m$ **(µM)** | $k_{cat}$ **($s^{-1}$)** | $k_{cat}/K_m$ **($M^{-1}/s^{-1}$)** |
|---|---|---|---|
| WT | 356.7 ± 12,1 | 5,2 ± 0,04 | 1,5 x $10^4$ |
| DM | 680,4 ± 56,9** | 3,3 ± 0,07*** | 4,8 x $10^3$ |

Teste t comparando os valores de cada parâmetro entre as enzimas WT e DM (**$P < 0,05$ e *** $P < 0,001$).
Os valores representam a média ± erro padrão da triplicata experimental.
Os parâmetros foram calculados usando o programa GraphPad Prism 5.0.

Como mostra a figura 1.11, observamos uma diminuição na atividade gutaminásica para ambas enzimas. A enzima WT teve sua atividade reduzida somente quando utilizada a concentração mais baixa de substrato (0,5 mM). Já a enzima DM apresentou uma diminuição na atividade em ambas as concentrações, sendo que a maior redução foi observada com 0,5 mM de L-glutamina. Quando comparamos as atividades entre as duas enzimas, concluímos que a proteoforma DM apresenta uma diminuição significativa na taxa de hidrólise, de 3,7 U/mg para 2,6 U/mg com 2 mM de substrato, e de 2,8 U/mg para 1,6 U/mg com 0,5 mM de L-glutamina.

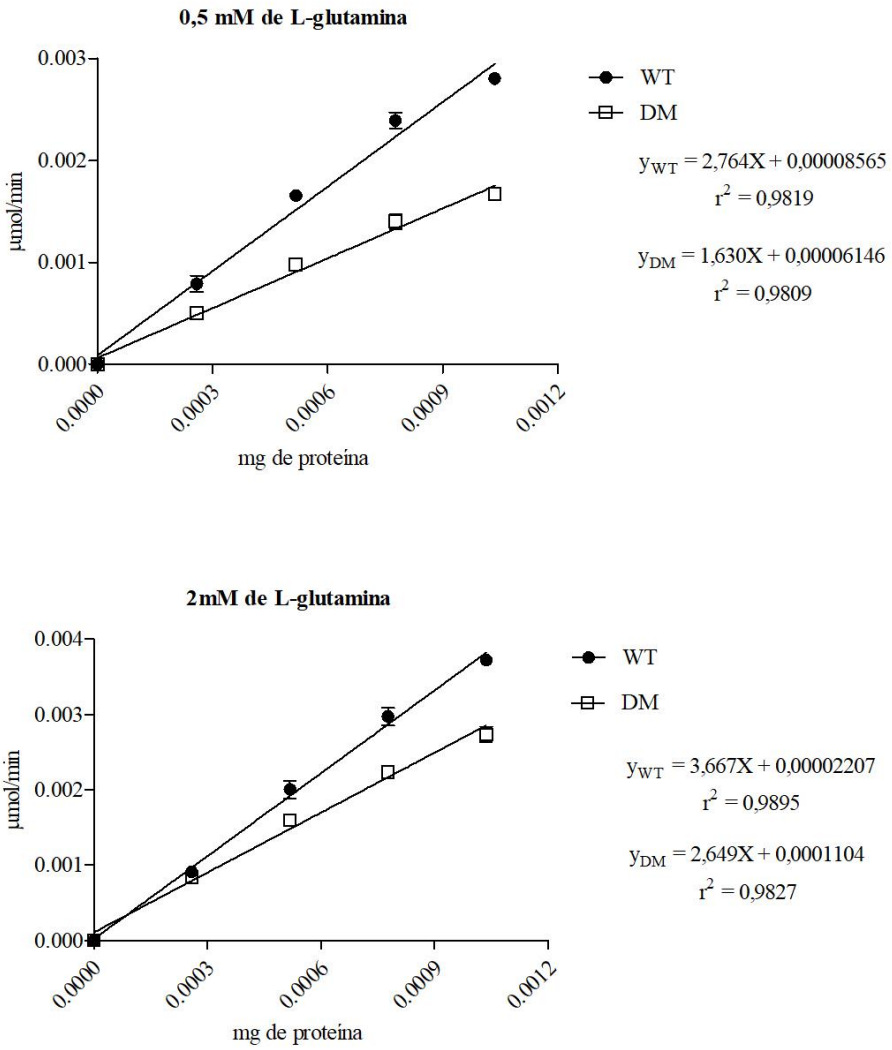



Figura 1.11 - Atividade específica das enzimas WT e DM utilizando como substrato a L-glutamina nas concentrações de 0,5 e 2,0 mM. Gráfico da velocidade de hidrólise em µmol/min em função da quantidade em miligramas de proteína; a inclinação da regressão linear representa a atividade específica para cada enzima em U/mg (um U é equivalente a 1 µmol de ácido glutâmico produzido por minuto). Análise estatística usando o teste F comparando a inclinação das retas mostra diferença significativa entre as enzimas WT e DM para ambas as concentrações de substrato ($P < 0.0001$). O gráfico foi obtido por meio do programa GraphPad Prism 5.0. Os ensaios foram realizados em triplicata e representados pela média ± erro padrão.

#### 1.4.2.4. Determinação do pH ótimo, atividade em diferentes temperaturas e influência de cofatores

O pH ótimo da enzima DM foi determinado através do ensaio de atividade utilizando L-asparagina como substrato em diferentes pHs (figura 1.12A). A avaliação da temperatura ideal para catálise também foi feita através do ensaio de atividade específica em diferentes temperaturas, utilizando L-asparagina como substrato no pH ótimo da enzima (figura 1.12B). Para esses ensaios utilizamos o método colorimétrico com reagente de Nessler, uma vez que a variação de pH e temperatura afetariam a catálise das outras enzimas presentes no ensaio acoplado.

Os gráficos nos mostram que ambas as enzimas possuem o mesmo pH ótimo de 8,0; a análise de variação de temperatura mostra que a enzima WT apresenta uma maior atividade entre 40°C e 55°C, e somente após a exposição a 65°C a enzima WT perde atividade de forma significativa, aproximadamente 70%. Já a proteoforma DM apresenta atividade crescente até atingir sua maior atividade a 45°C, porém com 50°C já é possível observar uma perda de aproximadamente 80% da atividade. Ambas proteoformas são altamente ativas a 37°C, porém a enzima DM é menos estável em temperaturas elevadas.

Além do pH e temperatura que são importantes para atividade enzimática, algumas substâncias que podem estar presentes na corrente sanguínea e podem interferir no potencial catalítico da enzima foram avaliadas. As enzimas WT e DM foram incubadas previamente com diferentes concentrações de metais por 30 minutos a 37°C; posteriormente foi realizado o ensaio de atividade específica com reagente de Nessler.

Os metais utilizados foram $Ca^{2+}$, $K^{+}$, $Mg^{2+}$ e $Zn^{2+}$ nas concentrações de 0,5, 1,0, e 10,0 mM. As enzimas WT e DM apresentaram o mesmo comportamento, com o aumento da concentração do metal ambas as enzimas tendem a perder atividade (figura 1.12C). Os íons de $Ca^{2+}$ e $Mg^{2+}$ mesmo na concentração mais baixa de 0,5 mM já diminuem a atividade enzimática em aproximadamente 20 % em ambas as proteoformas. Já a presença do íon $K^{+}$ ocasiona uma diminuição da atividade da DM nas concentrações mais baixas, o que não é observado na enzima WT.

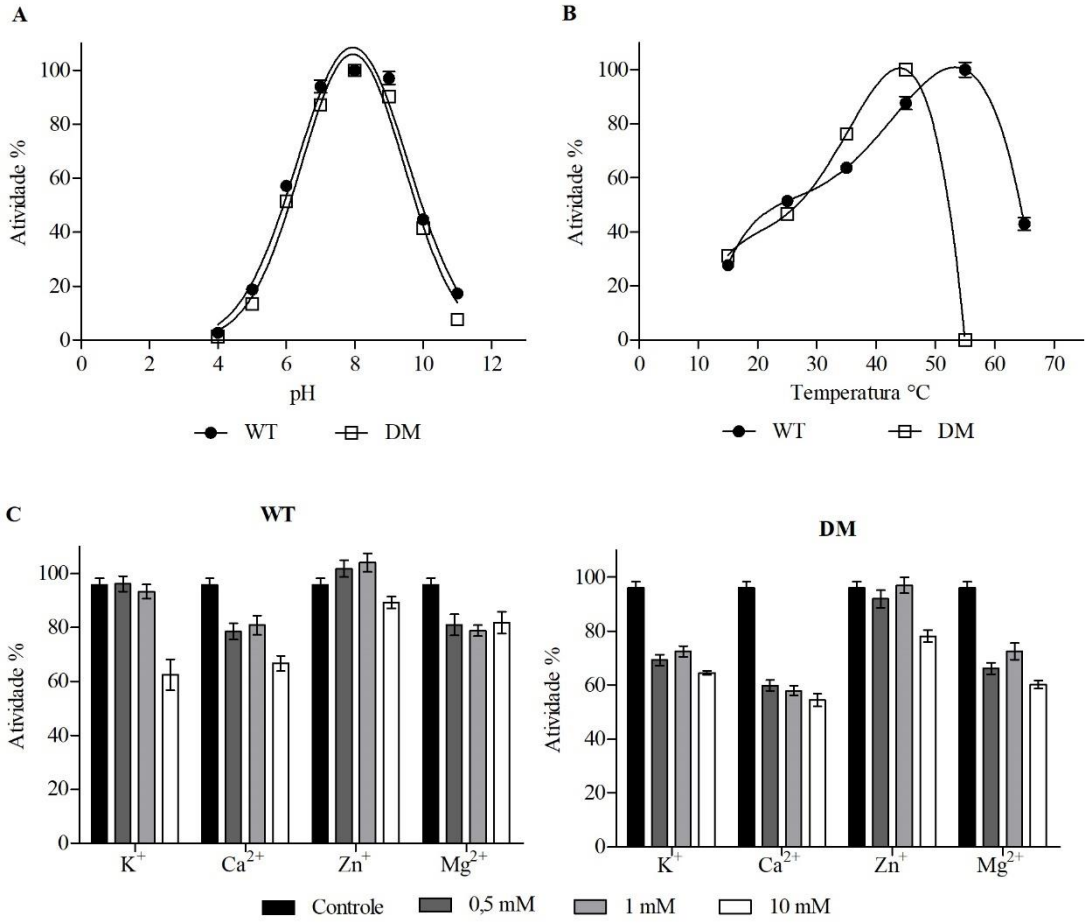



Figura 1.12 – Análise da atividade enzimática frente a variação de pH, temperatura e cofatores. A- Determinação do pH ótimo para hidrólise de L-asparagina das proteoformas WT e DM: as enzimas foram incubadas em tampões com diferentes pHs, e para diminuir o efeito da força iônica dos diferentes tampões foi adicionado 500 mM de NaCl em cada reação. B- As enzimas WT e DM tiveram suas atividades específicas determinadas variando a temperatura do ensaio entre 15°C e 65°C. C- Avaliação da influência de cofatores na atividade enzimática: a atividade específica das enzimas WT e DM foram determinadas após 30 minutos de incubação a 37°C na presença dos metais $K^+$, $Ca^{2+}$, $Zn^+$ e $Mg^{2+}$. Os ensaios foram realizados com reagente de Nessler em triplicata, as barras representam a média ± erro padrão.

### 1.4.2.5. Avaliação da estabilidade enzimática *in vitro* na presença de soro humano

Mesmo apresentando características bioquímicas muito semelhantes, a proteoforma DM mostra uma maior sensibilidade a variação de temperatura e na presença de alguns cofatores testados. Com esses resultados questionamos qual seria o comportamento da proteoforma DM na presença dos componentes da corrente sanguínea, onde seria sua atuação como biofármaco. Uma forma de avaliar esse comportamento foi incubando a enzima na presença de soro humano comercial (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) durante 6 dias e mensurando a atividade enzimática (figura 1.13).

Comparando as atividades da enzima WT com e sem adição de soro humano ao longo dos dias é possível verificar que no 6° dia a enzima sem soro humano perde 50 % de sua atividade; já na presença do soro humano a enzima se mostra estável ao longo dos 5 primeiros dias, apresentando uma redução na atividade somente no 6° dia. O mesmo padrão de comportamento é observado para a enzima DM; na presença de soro humano a proteoforma se mostra mais estável ao longo dos 5 primeiros dias, com perda de atividade no 6° dia; porém, na ausência de soro humano a partir do 5° dia a enzima DM apresenta uma perda de atividade mais acentuada do que a enzima WT. Contudo, a presença de soro humano além de aumentar a estabilidade de ambas enzimas, promove o aumento da atividade específica, deixando ambas enzimas com a atividade específicas muito próximas.

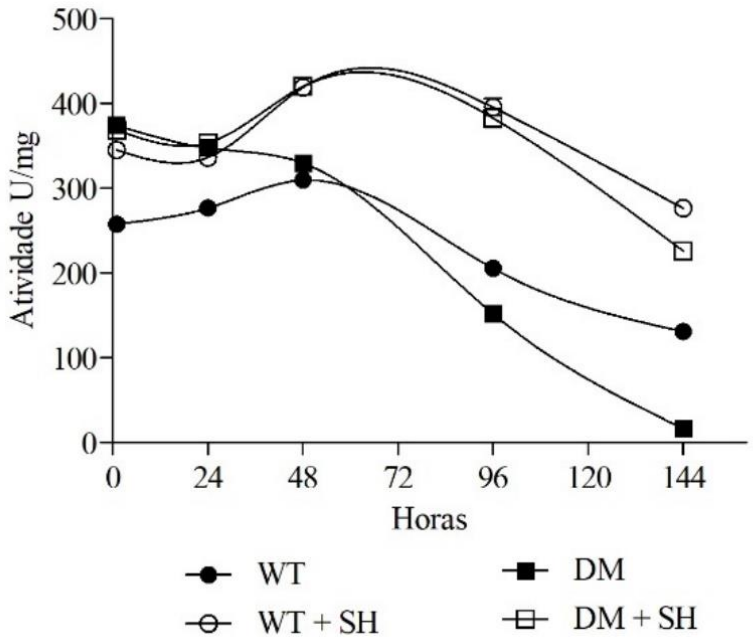



Figura 1.13 - Efeito do soro humano na atividade enzimática das proteoformas WT e DM. Atividade específica (U/mg) das enzimas incubadas com 10 % ou sem adição de soro humano (SH) (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) mostrando o aumento da atividade e estabilidade enzimática após incubação com 10% de soro humano ao longo de 144 horas (6 dias). Como controle, uma alíquota do soro humano, incubada na mesma condição das enzimas, foi retirada a cada dia, a amônia presente no soro foi quantificada e os valores obtidos do soro foram descontados dos valores obtidos durante a hidrólise enzimática. O ensaio foi realizado em triplicata e os dados representam a média ± erro padrão.

#### 1.4.2.6. Avaliação do potencial imunogênico *in silico* e *in vitro*

Considerando a importância das reações de imunogenicidade durante o tratamento com ASNase avaliamos *in silico* se o potencial imunogênico dessa proteoforma DM foi alterado pela inserção das mutações. Utilizando a ferramenta de bioinformática *Immune Epitope Data Base and Analysis Resource* (IEDB) (http://tools.immuneepitope.org/bcell/), através do algoritmo de *Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity*, analisamos o perfil de epítopos imunogênicos entre as enzimas WT e DM.

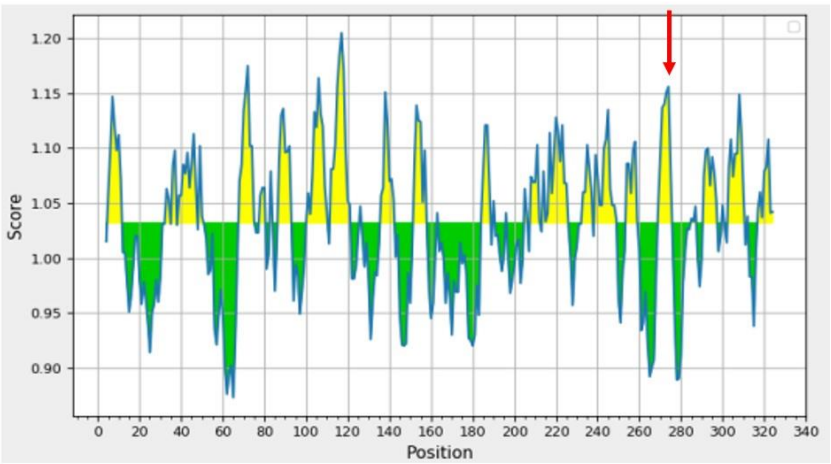
O algoritmo utiliza propriedades físico-químicas de resíduos de aminoácidos e a frequências de ocorrência em epítopos experimentalmente conhecidos. A aplicação deste método a um grande número de proteínas demonstrou que o mesmo pode prever determinantes antigênicos com uma precisão de aproximadamente 75% (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990).

Diferenças nos epítopos antigênicos foram encontradas entre os resíduos de aminoácidos da região onde foi inserida a mutação V272M (figura 1.14A). A sequência peptídica 269KGV**V**VIR275 da enzima WT foi prevista como antigênica; enquanto que na enzima DM, a mutação V272M reduziu o potencial antigênico desse peptídeo (figura 1.14B). A enzima WT apresenta um *score* de 1,14 nessa região e a enzima DM apresenta uma redução do *score* para 1,06, indicativo de que a redução na antigenicidade da região foi ocasionada pela mutação.

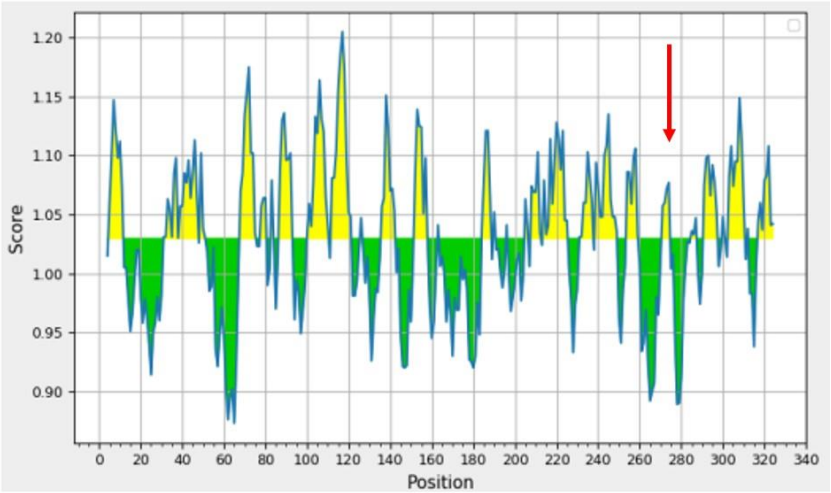
Após a predição *in silico* da redução de epítopos antigênicos na enzima DM, avaliamos o reconhecimento por anticorpos anti-asparaginase de *D. chrysanthemi* para as duas proteoformas por meio do ensaio de ELISA. O ensaio foi realizado utilizando diferentes quantidades de proteína para ambas enzimas. Nas condições testadas, a proteoforma DM apresentou uma redução significativa de reconhecimento de anticorpos quando comparada com a enzima WT (figura 1.15), de aproximadamente 62,5 ± 7,4%, sugerindo que a mutação V272M reduziu o potencial imunogênico da enzima.

**A**

**WT**




**DM**




**B**

| Posição | WT | | DM | |
|---|---|---|---|---|
| **Número** | **Aminoácido** | ***Score*** | **Aminoácido** | ***Score*** |
| 269 | K | 1,044 | K | 0,965 |
| 270 | G | 1,090 | G | 1,010 |
| 271 | V | 1,137 | V | 1,057 |
| 272 | V | 1,140 | M | 1,060 |
| 273 | V | 1,151 | V | 1,072 |
| 274 | I | 1,156 | I | 1,077 |
| 275 | R | 1,084 | R | 1,004 |

Figura 1.14 - Predição de epítopos antigênicos. A- Gráficos do potencial de epítopos antigênicos das enzimas WT e DM. Regiões consideradas antigênicas estão representadas em amarelo com *threshold* acima do *score* 1,032, e as regiões abaixo desse valor (em verde) não são consideradas antigênicas; a seta vermelha localiza a região com redução da antigenicidade. B – Quadro com o *score* para cada resíduo localizado da região antigênica da enzima WT e da região com a mutação V272M na enzima DM. Análise realizada pela ferramenta de bioinformática *Immune Epitope Data Base and Analysis Resource* (IEDB).

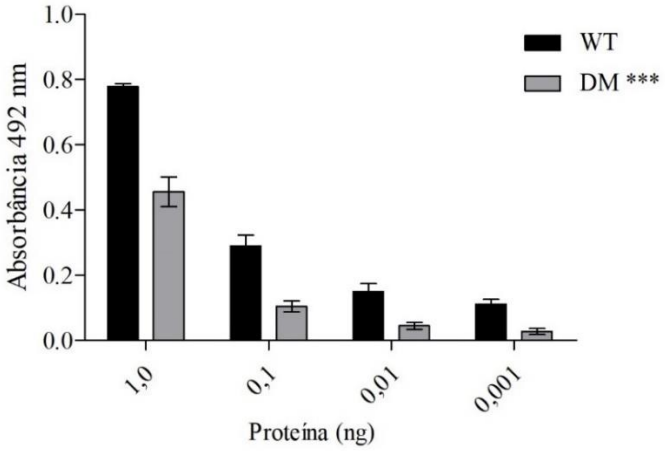



Figura 1.15 - Ensaio de ELISA para determinação de reconhecimento de anticorpo anti-ASNase de *D. chrysanthemi*. Diferentes quantidades das enzimas WT e DM, variando de 0,001 a 1,0 nanograma, foram expostas contra anticorpo anti-ASNase de *D. chrysanthemi*. A análise estatística usando *Two Away ANOVA* seguido de Bonferroni *post hoc* teste mostra diferença significativa entre os dados de DM e WT (*** $P <$ 0,001). O ensaio foi feito em triplicata as barras representam a média ± erro padrão. O gráfico foi obtido com o programa *GraphPad Prism* 5.0.

### 1.4.2.7. Avaliação de resistência a proteases séricas humanas

Um dos mecanismos de degradação e inativação das ASNases na corrente sanguínea é o reconhecimento pelas proteases CTSB e AEP e a formação de anticorpos que ocasionam a hipersensibilidade. A ASNase de *D. chrysanthemi* foi demonstrada como sensível à CTSB e resistente à AEP (PATEL et al., 2009). Através da exposição das enzimas WT e DM a essas proteases *in vitro*, verificamos que a dupla mutação não conferiu resistência à CTSB e nem alterou a resistência à AEP (figura 1.16).

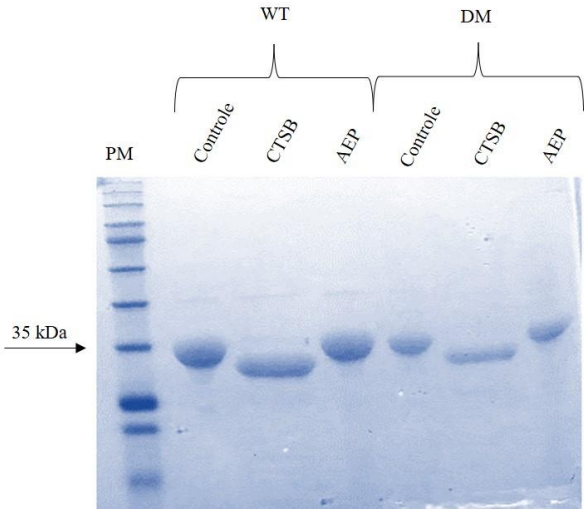


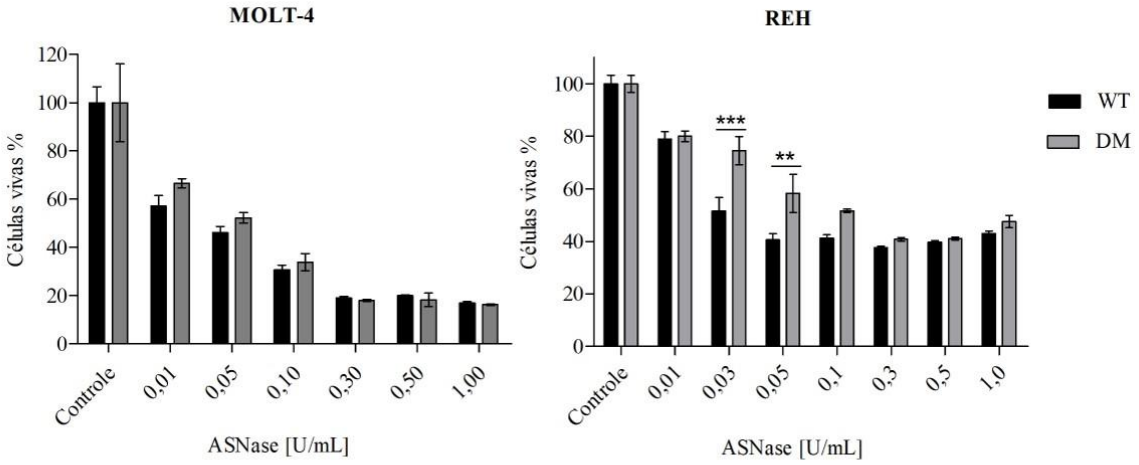

Figura 1.16 - Avaliação de resistência as proteases catepsina B (CTSB) e a asparagina endopeptidase (AEP). As enzimas WT e DM foram incubadas na presença das proteases CTSB e AEP por 24 horas e a análise da proteólise foi feita por SDS-PAGE 14%. PM é o padrão de massa molecular *BLUeye Prestained Protein Ladder* (GeneDirex, Taiwan).

#### 1.4.2.8. Potencial citotóxico da proteoforma DM em células de LLA *in vitro*

No ensaio de citotoxicidade utilizamos duas células de LLA: a MOLT-4 (células-T) e a REH (células pré-B) que possuem diferentes níveis de expressão de *ASNS*. As células MOLT-4 expressam baixos níveis de *ASNS* e são consideradas sensíveis ao tratamento. Entretanto, essas células podem aumentar os níveis de expressão de *ASNS* durante o tratamento em resposta a depleção de L-asparagina (BERTUCCIO et al., 2017; RICHARDS; KILBERG, 2006). Já as células REH são consideradas resistentes à ASNase por expressarem naturalmente altos níveis de *ASNS* (HERMANOVA et al., 2012).

As células de LLA MOLT-4 e REH foram tratadas com concentrações da enzima WT ou DM por 72 horas (figura 1.17); é importante ressaltar que devido a maior atividade específica da enzima DM (U/mg), a quantidade em nanogramas de proteína utilizada no ensaio para atingir a mesma concentração do que a enzima WT em U/mL, é aproximadamente 40% menor. Após o período de incubação a viabilidade celular foi avaliada por MTT, método colorimétrico que permite a quantificação de células metabolicamente ativas. As células vivas, com o metabolismo ativo, produzem oxirredutases NAD(P)H dependentes que reduzem o tetrazólio MTT ao composto Formazan de cor roxa, dessa maneira é possível quantificar as células viáveis em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

Embora a quantidade de proteína seja 40% menor, a proteoforma DM apresentou o mesmo perfil citotóxico que a proteoforma WT para a linhagem celular MOLT-4 e sem diferenças significativas no valor de $IC_{50}$. No entanto, a linhagem celular REH, apesar de apresentar o mesmo perfil citotóxico nas maiores concentrações da enzima (entre 0,1 e 1,0 U/mL), em doses intermediárias (0,03 e 0,05 U/mL) verificamos uma menor letalidade das células utilizando a enzima DM do que com a enzima WT, o que justifica a diferença observada nos valores de $IC_{50}$ entre as duas proteoformas (tabela 1.6). Esse perfil reflete a diferença observada na atividade específica das enzimas em baixas concentrações de L-glutamina (figura 1.11), onde 2 mM é concentração de L-glutamina presente no meio de cultura das células. Porém, mesmo com essa diferença o potencial citotóxico da enzima DM é equivalente ao da enzima WT em maiores concentrações enzimáticas.




| U/mL | ng de proteína | |
|---|---|---|
| | WT | DM |
| 0,01 | 5,59 | 3,40 |
| 0,03 | 16,78 | 10,21 |
| 0,05 | 27,97 | 17,02 |
| 0,1 | 55,95 | 34,05 |
| 0,3 | 167,85 | 102,15 |
| 0,5 | 279,75 | 170,25 |
| 1,0 | 559,5 | 340,50 |

Figura 1.17 - Ensaio de citotoxicidade das enzimas WT e DM usando as linhagens de LLA MOLT-4 e REH cultivadas *in vitro*. Gráfico da quantidade de células vivas em função da concentração da atividade de enzima (U/mL) após o tratamento com WT ou DM por 72 horas. Os controles são células na presença do tampão de diluição da enzima (50 mM Tris-HCl pH 7,4) cultivadas nas mesmas condições e foram consideradas como 100% de viabilidade. O quadro mostra a diferença nas quantidades de proteína em nanograma utilizada no ensaio entre a enzima WT e DM para cada concentração de enzima (U/mL). Análises estatísticas usando *Two way ANOVA* seguida por Bonferroni *post hoc* teste comparando cada concentração de enzima, mostra uma diferença significativa entre as proteoformas WT e DM (*** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$).

Tabela 1.6 – Valores de $IC_{50}$ determinado a partir do ensaio de citotoxicidade

| **$IC_{50}$ ± erro padrão [U/mL]** | | | |
|---|---|---|---|
| **Linhagem celular** | **WT** | **DM** | ***P value* *** |
| MOLT-4 | 0,011 ± 0,0037 | 0,022 ± 0,0056 | 0,1650 |
| REH | 0,014 ± 0,0013 | 0,026 ± 0,005 | 0,0309 |

*Análise estatística dos dados comparando os valores de $IC_{50}$ entre as duas proteoformas pelo teste F, onde $P < 0,05$ indica diferença significativa entres os valores de $IC_{50}$ das enzimas WT e DM.

## 1.5.DISCUSSÃO

Quando a biblioteca de mutantes gerada por epPCR foi criada, todos os clones foram submetidos a uma triagem preliminar: após cultivo e expressão os clones foram individualmente submetidos ao choque osmótico; a presença de proteínas foi confirmada por Bradford e, em seguida, os lisados proteicos foram incubados com asparagina e foi adicionado o reagente de Nessler. Após mensurar as absorbâncias, os valores obtidos foram comparados com o valor da atividade da proteína selvagem e, assim, estimada a atividade para cada clone da biblioteca (CUSTÓDIO, 2018). Apesar dos controles utilizados no ensaio (atividade dos lisados de células transformadas com o vetor de expressão pET-15b vazio, crescidas e induzidas nas mesmas condições), provavelmente a presença de outras proteínas e diferenças no nível de expressão de cada clone poderiam ter interferido na quantificação da amônia produzida. Por isso, foi importante a análise das proteínas purificadas nesse trabalho.

Após a purificação, conseguimos obter todas as proteoformas com elevado teor de pureza, o que permitiu a quantificação precisa das ASNases puras por meio do coeficiente de extinção molar, eliminando possíveis interferências causadas por proteínas contaminantes. Ao analisar a atividade específica dos dez mutantes, concluímos que nove dos dez mutantes não apresentaram melhoria na atividade específica.

As enzimas com atividade específica menor ou equivalente à enzima WT não foram selecionadas para caracterização bioquímica, porque os níveis séricos de L-asparagina em humano são de aproximadamente 40 μM a 80 μM. Portanto, para ser considerada uma enzima com potencial efeito antineoplásico é necessário que a enzima seja altamente ativa em baixas concentrações de substrato e mantenha os níveis séricos de L-asparagina baixos (BOOS et al., 1996; BROOME, 1968; COSTA-SILVA et al., 2020).

As ASNases disponíveis para o tratamento da LLA, de *E. coli* e *D. chrysanthemi*, possuem uma alta afinidade pela L-asparagina e baixa afinidade por L-glutamina (DERST; HENSELING; RÖHM, 2000; KOTZIA; LABROU, 2007). Essa afinidade pelo substrato é caracterizada pelos parâmetros cinéticos enzimáticos e está diretamente relacionado com a atividade específica da enzima. Assim, uma enzima com menor atividade específica para L-asparagina não seria interessante para aplicação biotecnológica farmacêutica, uma vez que seriam necessárias doses maiores e com menores intervalos para alcançar o efeito terapêutico

desejado. Além disso, o aumento da dose e da frequência de aplicação poderia implicar no aumento de efeitos adversos e maior incômodo aos pacientes.

A proteoforma DM foi a única a apresentar atividade superior à enzima WT. A dupla mutação aumentou a atividade específica para L-asparagina em aproximadamente 50%, confirmada por duas metodologias diferentes. O aumento da atividade específica da DM foi reflexo do aumento na velocidade de conversão do substrato em produto, aumentando o número de moléculas catalisadas por segundo. A enzima DM apresentou um aumento de 30% no $k_{cat}$ sem alteração estatisticamente significativa na afinidade pelo substrato. Com isso, a eficiência catalítica se manteve a mesma, mas na prática, é preciso menor quantidade de enzima para alcançar a velocidade máxima de reação.

Quando analisamos a catálise enzimática na presença de L-glutamina, verificamos que em condições saturantes de substrato (20 mM) não houve alterações na atividade específica. Entretanto, os parâmetros cinéticos mostram que a enzima DM possui menor afinidade por esse substrato. Essa diferença fica evidente quando utilizamos menores concentrações de substrato (0,5 mM e 2 mM) no ensaio de atividade específica. Na concentração sérica desse aminoácido (0,5 mM) a redução na atividade glutaminásica é de 40% em relação à enzima WT.

Apesar da proteoforma DM apresentar menor atividade em elevadas temperaturas, essa proteoforma se mostrou altamente ativa em condições fisiológicas (pH 7,4 a 37°C). A análise na presença de alguns cofatores mostrou que íons metálicos influenciaram a atividade enzimática de ambas as proteoformas *in vitro*. As concentrações séricas normais desses íons variam entre 2,2 a 2,6 mM de $Ca^{2+}$, de 0,65 a 1,05 mM de $Mg^{2+}$, de 0,013 a 0,1 mM de $Zn^{2+}$ e de 3,5 a 5 mM de $K^{+}$ (GOLDSTEIN, 2012; GONZÁLEZ-REVALDERÍA et al., 1990; JAHNEN-DECHENT; KETTELER, 2012; KLOOSTERMAN et al., 2008). Os íons $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ e $K^{+}$ apresentaram maior influência na atividade já nas concentrações abaixo das encontradas no sangue. Os íons Ca2+, Mg2+ afetam ambas as proteoformas, e o íon de potássio alterou somente a proteoforma DM.

Contudo, quando incubadas na presença do soro humano foi observado um aumento da atividade e da estabilidade de ambas as enzimas. A complexidade da composição do soro sugere que a interferência negativa dos íons metálicos na atividade enzimática é irrelevante e parece ter influência somente quando analisados isoladamente. Portanto, assim com a enzima WT, a proteoforma DM pode vir a ser altamente ativa em condições fisiológicas.

As duas mutações da proteoforma DM estão localizadas no domínio C-terminal da proteína. A mutação Q227E localizada na interface de dois monômeros fica próxima aos

resíduos do sítio ativo. Resíduos da porção C-terminal que interagem com resíduos do sítio ativo do monômero adjacente já foram relatados, como é o caso do resíduo S254 que interage diretamente com o resíduo D96, localizado no domínio N-terminal do outro monômero, influenciando na rigidez do tetrâmero (MILLER et al., 1993). Além disso, o resíduo D96 está localizado no sítio ativo da enzima e interage diretamente com o substrato (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001b). Já foi demonstrado que mutações no resíduo S254 altera significativamente a atividade enzimática, pois esse resíduo é responsável por orientar a cadeia lateral do resíduo D96 (NGUYEN; SU; LAVIE, 2016b). Desta maneira, a mutação Q227E, por estar próxima aos resíduos do sítio ativo, pode ter promovido alterações na interação desses aminoácidos.

Apesar de não fazerem parte do sítio ativo, as mutações influenciaram diretamente na catálise, estabilidade térmica e na estrutura secundária da proteína. A influência de mutações distantes do sítio ativo já foi observada em outras proteoformas de ASNase de *D. chrysanthemi*. Kotzia e Labrou (2009) obtiveram um mutante da ASNase de *D. chrysanthemi* que apresentou uma melhor termoestabilidade. A mutação no resíduo D133V localizado na superficie da proteína, alterou o potencial eletrostático, o que reduziu as perturbações estruturais e aumentou a termoestabilidade da enzima. No entanto, apesar de ser um resíduo distante do sítio ativo, a mutação piorou os parâmetros cinéticos da enzima, pois a alteração do resíduo D133V pode desestabilizar a interação do substrato com o resíduo A139, responsável pela flexibilidade do *loop* envolvido na catálise.

Outras duas mutações realizadas na ASNase de *D. chrysanthemi* promoveram alterações nos parâmetros cinéticos e na termoestabilidade, com alterações na estrutura secundária. A mutação N41D resultou na perda de uma ponte de hidrogênio entre os resíduos D37 e N41, com um aumento de 16% de α-hélice, o que promoveu uma maior mobilidade do *loop* do sítio ativo, acarretando o aumento do $k_{cat}$. No entanto, a mutação N181D promoveu perdas de pontes de hidrogênio na formação do tetrâmero, com uma redução de 6% de α-hélice deixando a estrutura mais frouxa e, consequentemente, um sítio ativo mais aberto, o que levou ao aumento do $K_m$ e menor estabilidade térmica da molécula (GERVAIS; FOOTE, 2014).

Em conjunto, as alterações ocasionadas pela dupla mutação na proteína podem contribuir para a redução de efeitos adversos observados durante o tratamento com ASNase. Visto que a utilização da ASNase de *D. chrysanthemi* durante o tratamento da LLA exige um aumento de dose e frequência, uma vez que o seu tempo de meia vida sérica é inferior ao das enzimas advindas de *E. coli*, e que a sua atividade glutaminásica é superior, o aumento de

alguns efeitos adversos decorrente da reação de hidrólise de L-glutamina vem sendo observado nos pacientes (GOSSAI et al., 2018; RAETZ; SALZER, 2010).

Um dos efeitos relatados é a hiperamonemia, causada pelo excesso de amônia, responsável pelo surgimento de náuseas, vômitos, fadiga, hepatotoxicidade e neurotoxicidade (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; RAETZ; SALZER, 2010; STRICKLER et al., 2018). Além disso, sabe-se que níveis elevados de amônia e ácido L-glutâmico estão associados à encefalopatia e apoptose de neurônios, podendo levar à morte (BEZIAT et al., 2019; FRANTZESKAKI et al., 2013; HIJIYA; VAN DER SLUIS, 2016).

Além da redução da atividade glutaminásica ocasionada pela alteração dos parâmetros cinéticos da proteoforma DM, a redução também pode acontecer devido a menor quantidade de enzima necessária para alcançar a mesma taxa de hidrólise de L-asparagina do que a enzima WT. Utilizando aproximadamente 50% menos enzima DM é possível alcançar a mesma atividade específica para L-asparagina do que a enzima WT. Dessa maneira, a taxa de hidrólise para L-glutamina também seria reduzida, uma vez que ambos os substratos competem pelo mesmo sítio ativo (DERST; HENSELING; RÖHM, 2000; KOTZIA; LABROU, 2007).

Contudo, a hidrólise secundária de L-glutamina é discutida na literatura como importante para eficácia do tratamento, uma vez que algumas linhagens leucêmicas possuem ASNS e são capazes de sintetizar L-asparagina (EMADI; ZOKAEE; SAUSVILLE, 2014; LOMELINO et al., 2017). Deste modo, manter uma atividade mínima para L-glutamina é considerada importante para o tratamento de linhagens leucêmicas que expressam ASNS (CHAN et al., 2014). Considerando a heterogeneidade intrínseca dos tumores, essa pode ser uma característica muito importante.

Além da redução na taxa de hidrólise para L-glutamina, uma mutação que proporcionasse resistência à protease CTSB poderia contribuir com um uma menor inativação enzimática e aumento da meia-vida sérica da enzima (VAN DER MEER et al., 2014, 2017). Porém, a dupla mutação não foi capaz de conferir resistência à CTSB, mas manteve a insensibilidade à AEP. Apesar disso, observamos um menor reconhecimento por anticorpos anti-ASNase de *D. chrysanthemi in vitro* da enzima DM quando comparada com a enzima WT. Esse dado corroborou a análise *in silico* da proteoforma DM, que demonstrou uma redução no *score* de antigenicidade na região que contém a mutação V272M, indicativo que essa mutação pode possuir papel importante na redução de epítopos imunogênicos.

A valina é um resíduo hidrofóbico e está localizado na superfície da ASNase de *D. chrysanthemi*. Quando esse resíduo está na superfície ele comumente faz parte de

determinantes antigênicos, enquanto que para metionina essa prevalência é menos comum (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990). A redução de epítopos imunogênicos na enzima pode contribuir significativamente para a redução da imunogenicidade durante o tratamento, visto que a imunogenicidade é um efeito adverso reportado por até 60% dos pacientes e pode acarretar na interrupção do uso da ASNase, piorando o prognóstico (PIETERS et al., 2011; RIZZARI et al., 2013).

A ASNase de *D. chrysanthemi* é naturalmente menos imunogênica de que a ASNase de *E. coli*, porém ainda é responsável por induzir a resposta imunológica em 33 % dos pacientes (PIETERS et al., 2011; RIZZARI et al., 2013). A ação desses anticorpos é a principal causa de hipersensibilidade, e são responsáveis pela redução da atividade e inativação enzimática, levando a interrupção do tratamento e aumentando das chances de recidiva (ASSELIN; RIZZARI, 2015; CECCONELLO et al., 2020; HIJIYA; VAN DER SLUIS, 2016; RAETZ; SALZER, 2010).

Nos pacientes que apresentam quadros severos de toxicidade ocasionados pela hidrólise de L-glutamina, ou nos casos de imunogenicidade e inativação enzimática, o tratamento com ASNase é descontinuado devido às chances de óbito (BEZIAT et al., 2019; GOSSAI et al., 2018; NIKONOROVA et al., 2019; STRICKLER et al., 2018). Por isso, reduzir os efeitos adversos pode contribuir significativamente para eficácia do tratamento e qualidade de vida dos pacientes que possuem em sua maioria alta expectativa de vida, visto que o pico de incidência da LLA ocorre aos 5 anos de idade (KATZ et al., 2015).

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* demonstram que a proteoforma DM possui potencial para ser uma alternativa no tratamento da LLA. Apesar da diferença no potencial de hidrólise da L-glutamina resultar na alteração dos valores de $IC_{50}$ para células REH de LLA, as quais são descritas como resistentes ao tratamento por expressarem altos níveis de *ASNS* (HERMANOVA et al., 2012), quando observamos a taxa de mortalidade das células utilizando dose ≥ 0,1 U/mL de enzima não encontramos diferenças significativas no potencial citotóxico entre as enzimas WT e DM.

Esse dado é indicativo de que a proteoforma mutante pode ser tão eficaz quanto à enzima selvagem. Isso porque, a concentração sérica mínima de ASNase necessária para garantir a eficácia no tratamento é de 0,1 U/mL. Abaixo dessa concentração é realizada a substituição por outra ASNase para continuidade do tratamento (HIJIYA; VAN DER SLUIS, 2016; KOPRIVNIKAR; MCCLOSKEY; FADERL, 2017). Já para as células MOLT-4 não observamos diferenças significativas nos valores de $IC_{50}$, mostrando que a proteoforma DM é eficaz em células que expressam baixos níveis de *ASNS*.

## 1.6. CONCLUSÃO

Dos dez clones previamente selecionados da biblioteca gerada por epPCR somente um apresentou alterações nos parâmetros cinéticos em relação à enzima WT. Demonstramos que a dupla mutação Q227E/V272M aumentou em aproximadamente 50% a atividade asparaginásica, possibilitando a redução da quantidade de enzima necessária para obter a mesma taxa de hidrólise que a enzima selvagem; a enzima DM também possui menor afinidade pelo substrato L-glutamina, resultando na menor atividade glutaminásica em baixas concentrações desse substrato; os ensaios *in vitro* realizados com as células de LLA MOLT-4 e REH mostraram que apesar da menor atividade glutaminásica, a proteoforma DM possui o mesmo potencial citotóxico do que a enzima WT utilizando a concentração mínima de ASNase requerida para o tratamento (0,1 U/mL); o ensaio de ELISA usando anticorpo anti-ASNase de *D. chrysanthemi* demonstrou que a enzima DM é menos reconhecida por anticorpos do que a enzima WT.

Em conjunto, os dados sugerem que a proteoforma DM pode contribuir para a redução dos efeitos adversos severos ocasionados pelo desbalanço nas concentrações de L-glutamina, ácido glutâmico e amônia, além da redução do potencial de imunogenicidade, o que melhoraria a qualidade de vida dos pacientes e aumentaria as taxas de remissão da doença.

Esses dados foram publicados no periódico *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* (anexo D).

## 1.7. PERSPECTIVAS

A proteoforma DM apresenta características que podem contribuir para redução de efeitos adversos, porém estudos adicionais precisam ser realizados para a confirmação dessa hipótese. Estudos *in vivo*, utilizando modelos animais, são necessários para avaliar a produção de anticorpos anti-ASNase, a meia-vida enzimática, a toxicidade dessa biomolécula e a real resposta antileucêmica utilizando modelos xenográficos de camundongos com LLA. Além disso, nós produzimos somente pequenos volumes de cultivo e purificação, pensando na aplicação biotecnológica, serão necessários estudos para o aumento da escala de produção. Novas mutações visando a termoestabilidade poderiam ser inseridas e testadas.

# REFERÊNCIAS

AGHAIYPOUR, Khosrow; WLODAWER, Alexander; LUBKOWSKI, Jacek. Do bacterial L -asparaginases utilize a catalytic triad Thr-Tyr-Glu ? *[S. l.]*, v. 1550, p. 117–128, 2001. a.

AGHAIYPOUR, Khosrow; WLODAWER, Alexander; LUBKOWSKI, Jacek. Structural basis for the activity and substrate specificity of Erwinia chrysanthemi L-asparaginase. **Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 40, n. 19, p. 5655–5664, 2001. b. DOI: 10.1021/bi0029595.

ASSELIN, Barbara; RIZZARI, Carmelo. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. **Leukemia and Lymphoma**, *[S. l.]*, v. 56, n. 8, p. 2273–2280, 2015. DOI: 10.3109/10428194.2014.1003056.

BELVISO, Stefania; IULIANO, Rodolfo; AMATO, Rosario; PERROTTI, Nicola; MENNITI, Miranda. The human asparaginase enzyme (ASPG) inhibits growth in leukemic cells. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 12, n. 5, p. 1–14, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0178174.

BERTUCCIO, Salvatore Nicola; SERRAVALLE, Salvatore; ASTOLFI, Annalisa; LONETTI, Annalisa; INDIO, Valentina; LESZL, Anna; PESSION, Andrea; MELCHIONDA, Fraia. Identification of a Cytogenetic and molecular subgroup of acute myeloid leukemias showing sensitivity to L-asparaginase. **Oncotarget**, *[S. l.]*, v. 8, n. 66, p. 109915–109923, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.18565.

BEZIAT, Guillaume; TAVITIAN, Suzanne; PICARD, Muriel; FAGUER, Stanislas; RECHER, Christian; HUGUET, Françoise. Multiple Severe Toxicities of L-Asparaginase and Their Innovative Management during Induction Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia in an Adult Patient. **Case Reports in Hematology**, *[S. l.]*, v. 2019, p. 1–6, 2019. DOI: 10.1155/2019/9086570.

BOOS, J.; WERBER, G.; AHLKE, E.; SCHULZE-WESTHOFF, P.; NOWAK-GÖTTL, U.; WÜRTHWEIN, G.; VERSPOHL, E. J.; RITTER, J.; JÜRGENS, H. Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. **European Journal of Cancer Part A**, *[S. l.]*, v. 32, n. 9, p. 1544–1550, 1996. DOI: 10.1016/0959-8049(96)00131-1.

BOREK, Dominika; JASKÓLSKI, Mariusz. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. **Acta Biochimica Polonica**, *[S. l.]*, v. 48, n. 4, p. 893–902, 2001. DOI: 10.18388/abp.2001_3855.

BROOME, J. D. FACTORS WHICH MAY INFLUENCE THE EFFECTIVENESS OF L-ASPARAGINASES AS TUMOR INHIBITORS. *[S. l.]*, n. 1964, p. 595–602, 1968.

CANTOR, Jason R.; STONE, Everett M.; CHANTRANUPONG, Lynne; GEORGIOU, George. The Human Asparaginase-Like Protein 1 hASRGL1is an Ntn Hydrolase with β-aspartyl Peptidase Activity Jason. **Bone**, *[S. l.]*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014. DOI: 10.1021/bi901397h.The. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf.

CECCONELLO, Daiane Keller; MAGALHÃES, Mariana Rodrigues De; WERLANG, Isabel

Cristina Ribas; LEE, Maria Lucia de Martino; MICHALOWSKI, Mariana Bohns; DAUDT, Liane Esteves. Asparaginase: an old drug with new questions. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, *[S. l.]*, v. 42, n. 3, p. 275–282, 2020. DOI: 10.1016/j.htct.2019.07.010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.07.010.

CEDAR, H.; SCHWARTZ, J. H. Localization of the two-L-asparaginases in anaerobically grown Escherichia coli. **Journal of Biological Chemistry**, *[S. l.]*, v. 242, n. 16, p. 3753–3755, 1967. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)95875-8. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)95875-8.

CHAN, Wai Kin; LORENZI, Philip L.; ANISHKIN, Andriy; PURWAHA, Preeti; ROGERS, David M.; SUKHAREV, Sergei; REMPE, Susan B.; WEINSTEIN, John N. The glutaminase activity of L- Asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. **Blood**, *[S. l.]*, v. 123, n. 23, p. 3596–3606, 2014. DOI: 10.1182/blood-2013-10-535112.

COSTA-SILVA, T. A.; COSTA, I. M.; BIASOTO, H. P.; LIMA, G. M.; SILVA, C.; PESSOA, A.; MONTEIRO, G. Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer. **Blood Reviews**, *[S. l.]*, v. 43, p. 100651, 2020. DOI: 10.1016/j.blre.2020.100651. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100651.

COSTA, Iris Munhoz; SCHULTZ, Leonardo; DE ARAUJO BIANCHI PEDRA, Beatriz; LEITE, Mariana Silva Moreira; FARSKY, Sandra H. P.; DE OLIVEIRA, Marcos Antonio; PESSOA, Adalberto; MONTEIRO, Gisele. Recombinant L-asparaginase 1 from Saccharomyces cerevisiae: An allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Scientific Reports**, *[S. l.]*, v. 6, n. April, p. 1–11, 2016. DOI: 10.1038/srep36239.

CUSTÓDIO, Débora. **Caracterização de L-Asparaginase de Erwinia chrysanthemi melhorada por evolução sintética de proteínas e otimização das condições de produção.** 2018. *[S. l.]*, 2018. Disponível em: http://ieeeauthorcenter.ieee.org/wp-content/uploads/IEEE-Reference-Guide.pdf%0Ahttp://wwwlib.murdoch.edu.au/find/citation/ieee.html%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.cie.2019.07.022%0Ahttps://github.com/ethereum/wiki/wiki/White-Paper%0Ahttps://tore.tuhh.de/hand.

DEL CASALE, T.; SOLLITTI, P.; CHESNEY, R. H. Cytoplasmic L-asparaginase: Isolation of a defective strain and mapping of ansA. **Journal of Bacteriology**, *[S. l.]*, v. 154, n. 1, p. 513–515, 1983. DOI: 10.1128/jb.154.1.513-515.1983.

DERST, Christian; HENSELING, Johannes; RÖHM, Klaus-Heinrich. Engineering the substrate specificity of Escherichia coli asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248 . **Protein Science**, *[S. l.]*, v. 9, n. 10, p. 2009–2017, 2000. DOI: 10.1110/ps.9.10.2009.

EMADI, Ashkan; ZOKAEE, Hania; SAUSVILLE, Edward A. Asparaginase in the treatment of non-ALL hematologic malignancies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 73, n. 5, p. 875–883, 2014. DOI: 10.1007/s00280-014-2402-3.

FIGUEIREDO, Lisa; COLE, Peter D.; DRACHTMAN, Richard A. Asparaginase Erwinia chrysanthemi as a component of a multi-agent chemotherapeutic regimen for the treatment of

patients with acute lymphoblastic leukemia who have developed hypersensitivity to E. Coli-derived asparaginase. **Expert Review of Hematology**, *[S. l.]*, v. 9, n. 3, p. 227–234, 2016. DOI: 10.1586/17474086.2016.1142370.

FRANTZESKAKI, Frantzeska; RIZOS, Michalis; PAPATHANASSIOU, Matilda; NIKITAS, Nikitas; LERIKOU, Maria; ARMAGANIDIS, Apostolos; DIMOPOULOS, George. L-asparaginase fatal toxic encephalopathy during consolidation treatment in an adult with acute lymphoblastic leukemia. **American Journal of Case Reports**, *[S. l.]*, v. 14, p. 311–314, 2013. DOI: 10.12659/AJCR.889268.

GERVAIS, David; FOOTE, Nicholas. Recombinant Deamidated Mutants of Erwinia chrysanthemi l-Asparaginase Have Similar or Increased Activity Compared to Wild-Type Enzyme. **Molecular Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 56, n. 10, p. 865–877, 2014. DOI: 10.1007/s12033-014-9766-9.

GOLDSTEIN, Steve A. N. K2P Potassium Channels, Mysterious and Paradoxically Exciting. **Sci Signal**, *[S. l.]*, v. 184, n. 4, p. 1–9, 2012. DOI: 10.1126/scisignal.2002225.K2P.

GONZÁLEZ-REVALDERÍA, J.; GARCÍA-BERMEJO, S.; MENCHÉN-HERREROS, A.; FERNANDEZ-RODRIGUEZ, E. Biological variation of Zn, Cu, and Mg in serum of healthy subjects. **Clinical Chemistry**, *[S. l.]*, v. 36, n. 12, p. 2140–2141, 1990.

GOSSAI, Nathan; RICHARDS, Michael; BOMAN, Lara; MESSINGER, Yoav; GERNBACHER, Sara; PERKINS, Joanna; BOSTROM, Bruce. **Symptomatic Hyperammonemia with Erwinia chrysanthemi -derived Asparaginase in Pediatric Leukemia Patients**. [s.l: s.n.]. v. 40 DOI: 10.1097/MPH.0000000000001062.

HARMS, Etti; WEHNER, Andreas; JENNINGS, Michael P.; PUGH, Kathryn J.; BEACHAM, Ifor R.; ROHM, Klaus H. Construction of expression systems for Escherichia cofi asparaginase II and two-step purification of the recombinant enzyme from periplasmic extracts. **Protein Expression and Purification**, *[S. l.]*, v. 2, n. 2–3, p. 144–150, 1991. DOI: 10.1016/1046-5928(91)90063-O.

HERMANOVA, Ivana; ZALIOVA, Marketa; TRKA, Jan; STARKOVA, Julia. Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. **Experimental Hematology**, *[S. l.]*, v. 40, n. 8, p. 657–665, 2012. DOI: 10.1016/j.exphem.2012.04.005. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2012.04.005.

HIJIYA, Nobuko; VAN DER SLUIS, Inge M. **Asparaginase-Associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia**. [s.l: s.n.]. v. 57 DOI: 10.3109/10428194.2015.1101098.

IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro organisms. **Journal of General Microbiology**, *[S. l.]*, v. 76, n. 1, p. 85–99, 1973. DOI: 10.1099/00221287-76-1-85.

JAHNEN-DECHENT, Wilhelm; KETTELER, Markus. Magnesium basics. **CKJ: Clinical Kidney Journal**, *[S. l.]*, v. 5, n. SUPPL. 1, 2012. DOI: 10.1093/ndtplus/sfr163.

KARAMITROS, Christos S.; KONRAD, Manfred. Human 60-kDa lysophospholipase contains an N-terminal L-Asparaginase domain that is allosterically regulated by L-Asparagine. **Journal of Biological Chemistry**, *[S. l.]*, v. 289, n. 19, p. 12962–12975, 2014. DOI: 10.1074/jbc.M113.545038.

KATZ, Aaron J.; CHIA, Victoria M.; SCHOONEN, Wilma M.; KELSH, Michael A. **Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden**. [s.l.] : Springer International Publishing, 2015. v. 26 DOI: 10.1007/s10552-015-0657-6.

KLOOSTERMAN, Tomas G.; WITWICKI, Robert M.; VAN DER KOOI-POL, Magdalena M.; BIJLSMA, Jetta J. E.; KUIPERS, Oscar P. Opposite effects of Mn2+ and Zn2+ on PsaR-mediated expression of the virulence genes pcpA, prtA, and psaBCA of Streptococcus pneumoniae. **Journal of Bacteriology**, *[S. l.]*, v. 190, n. 15, p. 5382–5393, 2008. DOI: 10.1128/JB.00307-08.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, Prasad C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, *[S. l.]*, v. 276, n. 1–2, p. 172–174, 1990. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80535-Q.

KOPRIVNIKAR, Jamie; MCCLOSKEY, James; FADERL, Stefan. Safety, efficacy, and clinical utility of asparaginase in the treatment of adult patients with acute lymphoblastic leukemia. **OncoTargets and Therapy**, *[S. l.]*, v. 10, p. 1413–1422, 2017. DOI: 10.2147/OTT.S106810.

KOTZIA, Georgia A.; LABROU, Nikolaos E. l-Asparaginase from Erwinia Chrysanthemi 3937: Cloning, expression and characterization. **Journal of Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 127, n. 4, p. 657–669, 2007. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.07.037.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, *[S. l.]*, v. 227, p. 680–685, 1970.

LOMELINO, Carrie L.; ANDRING, Jacob T.; MCKENNA, Robert; KILBERG, Michael S. Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. **Journal of Biological Chemistry**, *[S. l.]*, v. 292, n. 49, p. 19952–19958, 2017. DOI: 10.1074/jbc.R117.819060. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R117.819060.

MILLER, Maria; RAO, J. K. Mohan.; WLODAWER, Alexander; GRIBSKOV, Michael R. A left-handed crossover involved in amidohydrolase catalysis. Crystal structure of Erwinia chrysanthemi l-asparaginase with bound l-aspartate. **FEBS Letters**, *[S. l.]*, v. 328, n. 3, p. 275–279, 1993. DOI: 10.1016/0014-5793(93)80943-O.

MINOWA, Kei; SUZUKI, Mitsuyoshi; FUJIMURA, Junya; SAITO, Masahiro; KOH, Katsuyoshi; KIKUCHI, Akira; HANADA, Ryoji; SHIMIZU, Toshiaki. **L-asparaginase-induced pancreatic injury is associated with an imbalance in plasma amino acid levels**. [s.l: s.n.]. v. 12 DOI: 10.2165/11632990-000000000-00000.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, *[S. l.]*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1039/c6ra17788c.

NARTA, Umesh K.; KANWAR, Shamsher S.; AZMI, Wamik. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, *[S. l.]*, v. 61, n. 3, p. 208–221, 2007. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2006.07.009.

NGUYEN, Hien Anh et al. A novel L-asparaginase with low L-glutaminase coactivity is highly efficacious against both T and B cell acute lymphoblastic leukemias in vivo. **Cancer Res**, *[S. l.]*, v. 78, n. 6, p. 1549–1560, 2018. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2106.

NGUYEN, Hien Anh; SU, Ying; LAVIE, Arnon. Structural Insight into Substrate Selectivity of Erwinia chrysanthemi L-Asparaginase. **Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 55, n. 8, p. 1246–1253, 2016. a. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01351.

NGUYEN, Hien Anh; SU, Ying; LAVIE, Arnon. Design and characterization of erwinia chrysanthemi L-asparaginase variants with diminished L-glutaminase activity. **Journal of Biological Chemistry**, *[S. l.]*, v. 291, n. 34, p. 17664–17676, 2016. b. DOI: 10.1074/jbc.M116.728485.

NIKONOROVA, Inna A.; ZHU, Qiaoqiao; SIGNORE, Christina C.; MIREK, Emily T.; JONSSON, William O.; KONG, Bo; GUO, Grace L.; BELDEN, William J.; ANTHONY, Tracy X. G. Age modulates liver responses to asparaginase-induced amino acid stress in mice. **Journal of Biological Chemistry**, *[S. l.]*, v. 294, n. 38, p. 12864–13875, 2019. DOI: 10.1074/jbc.RA119.009864.

NOMME, Julian; SU, Ying; LAVIE, Arnon. Elucidation of the specific function of the conserved threonine triad responsible for human l-Asparaginase autocleavage and substrate hydrolysis. **Journal of Molecular Biology**, *[S. l.]*, v. 426, n. 13, p. 2471–2485, 2014. DOI: 10.1016/j.jmb.2014.04.016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.016.

ORSONNEAU, J. L.; RASSART, E. A.; LECAME, M.; THOMARE, P.; DELAROCHE, O.; DUDOUET, D. Dosage automatique en cinétique de l'activite L-asparaginase plasmatique en suivi thérapeutique des leucémies aiguës lymphoblastiques. **Annales de Biologie Clinique**, *[S. l.]*, v. 62, n. 5, p. 568–72, 2004.

PIETERS, Rob; HUNGER, Stephen P.; BOOS, Joachim; RIZZARI, Carmelo; SILVERMAN, Lewis; BARUCHEL, Andre; GOEKBUGET, Nicola; SCHRAPPE, Martin; PUI, Ching Hon. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, *[S. l.]*, v. 117, n. 2, p. 238–249, 2011. DOI: 10.1002/cncr.25489.

RAETZ, Elizabeth A.; SALZER, Wanda L. Tolerability and efficacy of L-asparaginase therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, *[S. l.]*, v. 32, n. 7, p. 554–563, 2010. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3181e6f003.

REINERT, Rachel B. et al. **Role of glutamine depletion in directing tissue-specific nutrient stress responses to L-asparaginase**. [s.l: s.n.]. v. 281 DOI: 10.1074/jbc.M604511200.

RICHARDS, Nigel G. J.; KILBERG, Michael S. NIH Public Access. **Annu Rev Biochem**,

*[S. l.]*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2006. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142520.Asparagine.

RIGOUIN, Coraline; NGUYEN, Hien Anh; SCHALK, Amanda M.; LAVIE, Arnon. Discovery of human-like L-asparaginases with potential clinical use by directed evolution. **Scientific Reports**, *[S. l.]*, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-10758-4. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10758-4.

RIZZARI, Carmelo; CONTER, Valentino; STARÝ, Jan; COLOMBINI, Antonella; MOERICKE, Anja; SCHRAPPE, Martin. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current Opinion in Oncology**, *[S. l.]*, v. 25, n. SUPPL.1, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1097/CCO.0b013e32835d7d85.

SALZER, Wanda; SEIBEL, Nita; SMITH, Malcolm. Erwinia asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Expert Opinion on Biological Therapy**, *[S. l.]*, v. 12, n. 10, p. 1407–1414, 2012. DOI: 10.1517/14712598.2012.718327.

SHRIVASTAVA, Abhinav; KHAN, Abdul Arif; KHURSHID, Mohsin; KALAM, Mohd Abul; JAIN, Sudhir K.; SINGHAL, Pradeep K. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, *[S. l.]*, v. 100, p. 1–10, 2016. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.01.002. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.01.002.

STRICKLER, Nicole; BALABANOV, Stefan; CASAURO, Katharina; SCHANZ, Urs; MANZ, Markus G.; GERBER, Bernhard. **Acute central nervous system complications and ammonium levels in adult patients with acute lymphoblastic leukemia receiving L-asparaginase**. [s.l.] : Informa Healthcare USA, Inc, 2018. v. 59 DOI: 10.1080/10428194.2017.1352090. Disponível em: https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1352090.

VAN DER MEER, Laurens T. et al. A germ line mutation in cathepsin B points toward a role in asparaginase pharmacokinetics. **Blood**, *[S. l.]*, v. 124, n. 19, p. 3027–3029, 2014. DOI: 10.1182/blood-2014-06-582627.

VAN DER MEER, Laurens T. et al. In vivo imaging of antileukemic drug asparaginase reveals a rapid macrophage-mediated clearance from the bone marrow. **Journal of Nuclear Medicine**, *[S. l.]*, v. 58, n. 2, p. 214–220, 2017. DOI: 10.2967/jnumed.116.177741.

# CAPÍTULO 2

Avaliação da influência da proteína Catepsina B no mecanismo de resistência ao tratamento da LLA com L-asparaginase

Desenvolvido durante o estágio de pesquisa no exterior (BEPE – FAPESP) no Instituto de Pesquisa *Cold Spring Harbor Laboratory – New York/USA* - sob supervisão da Professora Dra. Camila Oresco dos Santos

# 2.1.INTRODUÇÃO

## 2.1.1. Resistência ao tratamento da LLA

Diferenças na expressão gênica contra uma condição ou estímulo particular induzidas por medicamentos e o desenvolvimento de resistência têm sido analisadas para elucidar o papel dos genes/proteínas na variação do fenótipo, desenvolver novos medicamentos e entender doenças complexas como o câncer (KHATOON et al., 2014; MELOUANE et al., 2018).

Alterações na expressão gênica que afetam a resposta à quimioterapia também têm sido associadas à LLA. Isso foi observado na análise da expressão gênica do modelo de camundongo B-ALL acionado por N-MYC após receber citarabina que revelou interações entre os receptores de citocinas e a desregulação da transcrição gênica no tumor (TANG et al., 2018); a hipersensibilidade à ASNase de *E. coli* em crianças com LLA foi associada ao fator nuclear de células T ativadas 2 (NFATC2) (FERNANDEZ et al., 2015).

Outro exemplo é a resistência ao tratamento pela expressão de *ASNS*. Algumas linhagens de LLA são consideradas naturalmente resistentes ao tratamento por expressarem altos níveis desse gene, que codifica a proteína asparagina sintetase responsável pela produção endógena de asparagina, como acontece com as células REH (HERMANOVA et al., 2012). No entanto, não são todas as células de LLA que expressam altos níveis de *ASNS*. As células MOLT-4 expressam baixos níveis de *ASNS*, porém durante o tratamento com a privação de L-asparagina, essas células regulam a expressão desse gene para suprir a deficiência desse aminoácido (BERTUCCIO et al., 2017; RICHARDS; KILBERG, 2006).

Outro mecanismo relacionado com a resistência ao tratamento é a degradação da ASNase pela protease catepsina B (CTSB), responsável pela redução da meia-vida desse biofármaco e, consequentemente, pelo comprometimento da eficácia do tratamento (PATEL et al., 2009; VAN DER MEER et al., 2014, 2017).

Patel (2009) demonstrou que a CTSB é capaz de degradar as ASNases de *E. coli* e de *D. chrysanthemi*. Reforçando essa hipótese, observou-se que um paciente em tratamento com a enzima de *D. chrysanthemi* apresentou hiperamonemia acentuada e aumento da meia-vida sérica da enzima. Após investigação, foi observado que o paciente apresentava uma mutação no gene que codifica a CTSB, o que impedia a ação correta da enzima, demonstrando que essa protease desempenha um papel importante na farmacocinética da ASNase (VAN DER MEER et al., 2014). Em 2017, o mesmo grupo, demonstrou em camundongos *knockout* para o

gene *CTSB*, que a meia-vida da ASNase era maior do que em camundongos do tipo selvagem (VAN DER MEER et al., 2017). No entanto, a relação entre a protease CTSB e a LLA ainda é pouco compreendida.

### 2.1.2. Proteína Catepsina B

A CTSB é uma cisteíno-protease lisossomal, expressa constitutivamente e está envolvida em vários processos biológicos. Essa proteína pode ser encontrada intra ou extracelular, em sua forma ativa (proteína madura) com aproximadamente 30 kDa ou em sua forma inativa (pró-proteína) com aproximadamente 37 kDa (HOOK et al., 2015).

Alterações em seu nível de expressão têm sido relacionadas a diversas doenças, incluindo a progressão de neoplasias. A relação da CTSB com a progressão da doença tem sido estudada em vários tipos de tumores sólidos (ANJA; ANAHID; JANKO, 2018; OLSON; JOYCE, 2015; POGORZELSKA; ŻOŁNOWSKA; BARTOSZEWSKI, 2018).

A CTSB tem sido extensivamente estudada e associada aos processos de proliferação, invasão e metástase das células cancerígenas. O aumento da expressão em diversas neoplasias (mama, pulmão, cólon, ovário, bexiga, pâncreas, tireoide, próstata) fez com que essa protease se tornasse um marcador prognóstico para alguns tipos de câncer (POGORZELSKA; ŻOŁNOWSKA; BARTOSZEWSKI, 2018).

Foi demonstrado que o papel da CTSB na oncogênese pode ser completamente diferente em diferentes tumores. Modelos animais de carcinoma mamário *knockout* para CTSB apresentaram redução do volume e proliferação tumoral, enquanto que em animais com carcinoma espinocelular não houve alteração na proliferação celular (OLSON; JOYCE, 2015). O aumento nos níveis de expressão da CTSB em tumores sólidos (*e.g.*, mama, pulmão, colón, próstata, glioma, entre outros) vem sendo observado e relacionado com a progressão da doença. Uma importante atuação da CTSB ocorre na matriz extracelular induzindo a angiogênese tumoral aumentando a progressão e a metástase (POGORZELSKA; ŻOŁNOWSKA; BARTOSZEWSKI, 2018).

Além disso, o aumento dos níveis de expressão de catepsinas em células tumorais após o tratamento quimioterápico desempenha um papel importante no processo de resposta reativa e adaptativa e pode levar à resistência terapêutica adquirida. Essa associação foi descrita em modelos de camundongos de câncer de mama, timo, pulmão e melanoma que receberam tratamento com gencitabina e 5-fluorouracil (OLSON; JOYCE, 2015).

Além da relação direta da CTSB com a clivagem da ASNase e sua meia-vida (PATEL et al., 2009; VAN DER MEER et al., 2014, 2017), nenhum outro envolvimento de proteases na progressão da doença, ou resposta ao tratamento foi descrita para LLA. Portanto, pouco se sabe sobre a relação da protease CTSB no tratamento da LLA, e seus papéis no metabolismo celular da LLA durante a exposição à ASNase.

### 2.1.3. Estudo proposto da relação CTSB e ASNase no tratamento da LLA

Existem diferentes células de LLA com diferentes fenótipos e alterações na expressão gênica, como na expressão de proteases. Por exemplo, a linhagem REH de LLA é capaz de expressar constitutivamente CTSB (PATEL et al., 2009), e altos níveis de ASNS ao contrário de outras linhagens de células de LLA (HERMANOVA et al., 2012). A expressão de ASNS e CTSB estão diretamente relacionadas à resposta ao tratamento com ASNase (CHEN, 2015; PATEL et al., 2009; VAN DER MEER et al., 2014, 2017).

A linhagem de LLA REH é uma célula pré-B (BCP-LLA) e possui a translocação *ETV6/RUNX1*. O gene *ETV6* codifica os fatores de transcrição da família ETS (específico da transformação E26), responsável pela diferenciação e crescimento das células hematopoiéticas e, o gene *RUNX1* codifica o fator de transcrição responsável pela expressão de genes envolvidos no processo de diferenciação das células-tronco (AKBARI et al., 2020). A BCP-LLA é o tipo de célula mais comum nos casos de LLA (BARISONE et al., 2015), e o fenótipo ETV6/RUNX1 representa 30% dos casos de LLA-B (MALARD; MOHTY, 2020).

Para avaliar o papel da CTSB na resistência ao tratamento com ASNase nas células LLA, optamos por produzir um clone *knockout* para a proteína CTSB utilizando a técnica *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) - associado à proteína 9 (cas9) (CRISPR/Cas9) e, para isso, utilizamos a linhagem celular REH como modelo por ser resistente e possuir um fenótipo prevalente nos casos de LLA.

Sabe-se que diferentes ASNases apresentam perfis farmacocinéticos e imunológicos distintos e podem responder de forma diferente à ação das proteases lisossômicas, resultando em diferentes respostas ao tratamento (RODRIGUES et al., 2020). Por isso, foram escolhidas três ASNases diferentes, duas enzimas do tipo selvagem, de *E. coli* (EcA_WT) e *D. chrysanthemi* (ErA_WT) e uma enzima mutante dupla de *E. chrysanthemi* (ErA_DM produzida e caracterizada nesse estudo, capítulo I) para tratar as células REH *knockout* para CTSB.

### 2.1.4. Resultados preliminares

Na construção do sistema CRISPR/Cas9 para deleção da proteína CTSB foi utilizado o plasmídeo de transferência LGR (Lenti_sgRNA-EFS_GFP) com *backbone* vazio para a inserção do sgRNA (Anexo E), o plasmídeo de empacotamento lentiviral psPAX2 (Anexo F) e o envelope que expressa o plasmídeo pMD2.G (Anexo G).

LGR é um plasmídeo modificado para expressar a proteína verde fluorescente (GFP - do inglês *green fluorescent protein*); com 9.298 pb, o LGR possui o promotor RNA polimerase III U6 para expressão de sgRNA e o promotor do fator de alongamento 1α curto (EFS) para expressão de GFP (SHI et al., 2015). O vetor LGR permite monitorar a produção de lentivírus e a taxa de infecção celular através da expressão de GFP. No entanto, o LGR não expressa cas9. As células de leucemia linfoblástica aguda REH e de carcinoma hepatocelular HEPG2 expressando cas9, utilizadas neste trabalho, foram gentilmente cedidas pelo laboratório do Professor Dr. Christopher Vakoc da *Cold Spring Harbor Laboratory* (CSHL).

A construção do vetor LGR + sgRNA utilizada nesse trabalho foi feita previamente pelo nosso grupo de pesquisa em colaboração com a professora Dra. Camila O. dos Santos da CSHL. Brevemente, após a obtenção e purificação dos plasmídeos, o LGR foi digerido com a enzima de restrição *BsmB1* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) para inserção dos primers de sgRNA projetados para o gene CTSB. Os cinco oligos de sgRNA (tabela 2.1), projetados com base na sequência do gene humano de Catepsina B ID: 1508 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=1508), foram previamente fosforilados e alinhados para ligação no vetor LGR linearizado. As reações de ligação foram transformadas na cepa de *E. coli Stbl3*$^{TM}$ e os clones foram selecionados por resistência à ampicilina.

Tabela 2.1 – Oligos desenhados codificando sgRNA para o gene *CTSB*

| Oligo | *Forward* 5' → 3' | *Reverse* 5' → 3' |
|---|---|---|
| sgRNA-1 | **CACCG**GCTTCGATGCACGGGAACAA | **AAAC**TTGTTCCCGTGCATCGAAGC |
| sgRNA-2 | **CACCG**TTCCACGCACCGATCAGTAC | **AAAC**GTACTGATCGGTGCGTGGAA |
| sgRNA-3 | **CACCG**CACCAATGCGCACGTCAGCG | **AAAC**CGCTGACGTGCGCATTGGTG |
| sgRNA-4 | **CACCG**TCATCTCTCCGGTGACGTGT | **AAAC**ACACGTCACCGGAGAGATGA |
| sgRNA-5 | **CACCG**GCCGTTGACGTGGTGCTCAC | **AAAC**GTGAGCACCACGTCAACGGC |

Em vermelho estão destacadas as extremidades adesivas para inserção no plasmídeo digerido com a enzima de restrição *Bsmb;* em azul está identificado o nucleotídeo de guanina adicionado para o início da transcrição.

## 2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir partículas virais para edição do gene *CTSB* pela técnica de CRISPR/cas9;
- Produzir células REH de LLA *knockout* para a proteína catepsina B;
- Avaliar a viabilidade das células REH *knockout* após o tratamento com diferentes L-asparaginases;

## 2.3.MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.3.1. Linhagem de células

- *E. coli One Shot*™ *Stbl3*™ (Invitrogen, Waltham, MA, EUA).
- *E. coli One shot*™ *BL21(DE3)* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA).
- Células humanas renais HEK 293T (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA).
- Células de leucemia linfoblástica aguda REH tipo selvagem (REH WT) e expressando a proteína cas9 (REHcas9), gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Christopher Vakoc da CSHL.
- Células humanas de carcinoma hepatocelular HEPG2 tipo selvagem (HEPG2 WT) e expressando a proteína cas9 (HEPG2cas9), gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Christopher Vakoc da CSHL.

As células tipo selvagem, são de origem do *American Type Culture Collection* (ATCC) (https://www.atcc.org/). As células expressando a proteína cas9 foram produzidas a partir das células selvagem pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Christopher Vakoc da CSHL.

### 2.3.2. Plasmídeos

- LGR (Lenti_sgRNA-EFS_GFP) (plasmídeo Addgene # 65656) (SHI et al., 2015).
- psPAX2 foi doado por Didier Trono (plasmídeo Addgene # 12260).
- pMD2.G foi doado por Didier Trono (plasmídeo Addgene # 12259).

### 2.3.3. Meios de cultura

Para o crescimento de bactérias:

- *Lysogeny broth* (LB): 1% Triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de NaCl;
- *Super Optimal broth with Catabolite repression* (SOC): 2% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,05% NaCl; KCl 2,5 mM; 10 mM de $MgCl_2$; glicose 20 mM; o pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH 5 N.
  2% de Agar quando o meio for sólido.

Para o crescimento de células humanas:

- RPMI 1640 (meio *Roswell Park Memorial Institute 1640*) GlutaMAX™ (Gibco, Grand Island, NY, EUA).
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco, Grand Island, NY, EUA).
- MEM (*Minimum Essential Media*) (Gibco, Grand Island, NY, EUA).
- Opit-MEM™ (Meio com soro reduzido) (Gibco, Grand Island, NY, EUA).
- Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA).

### 2.3.4. Obtenção das células *knockout* para *CTSB*

#### 2.3.4.1. Extração de plasmídeo

A cepa de *E. coli* Stbl3™ contendo o plasmídeo de interesse foi cultivada em 5 mL ou 100 mL de meio LB (para preparação de plasmídeo mini ou maxi, respectivamente) com a adição de 50 µg/mL de ampicilina a 37°C, durante a noite, sob 250 r.p.m. O inóculo foi utilizado para a extração do plasmídeo utilizando o kit *Qiagen Plasmid Mini ou Maxi* (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo o protocolo do fabricante. A extração do plasmídeo foi confirmada por eletroforese de DNA em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (4,84 g de Tris Base; 1,14 mL de ácido acético; 0,37 g de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA); para o volume final de 1 L de $H_2O$ mili - Q) com adição de 1,5 µg/mL de brometo de etídio para visualização em transiluminador com luz ultravioleta (UV).

#### 2.3.4.2. Transformação das células quimicamente competentes

As linhagens de *E. coli* quimicamente competente *One Shot*$^{TM}$ *Stbl3*$^{TM}$ e *BL21(DE3)* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) foram transformadas e utilizadas para clonagem vetorial e expressão de proteínas, respectivamente, seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, o plasmídeo foi adicionado à linhagem de *E. coli* quimicamente competente (*Stbl3*$^{TM}$ ou *BL21(DE3)*) e incubado por 30 minutos em gelo, em seguida, a mistura foi incubada por 45 segundos a 42°C e imediatamente devolvida ao gelo por 2 minutos. Em seguida, 250 µL de meio SOC foram adicionados e mantidos a 37°C por 60 minutos, agitando a 225 r.p.m. A mistura foi espalhada em LB-Agar + 50 µg/mL de ampicilina, a fim de obter clones transformantes.

#### 2.3.4.3. Confirmação da construção por sequenciamento

Para confirmar a construção correta de LGR + sgRNA para edição de CTSB, os clones transformantes obtidos previamente pelo nosso grupo em colaboração com o laboratório da Dra. Camila O. dos Santos foram isolados e cultivados em 5 mL de LB + 50 µg/mL de ampicilina a 37°C durante a noite, agitando a 250 r.p.m. Em seguida, o plasmídeo foi extraído conforme descrito no item 2.3.4.1 Os DNAs foram quantificados usando NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 1,0 µg de cada construção e 5 µM de primer promotor U6 (5'-AACCGGTGCCTAGAGAAGGT-3') foram enviados para sequenciamento no Laboratório *Cold Spring Harbor Laboratory's DNA Sequencing Facility*.

#### 2.3.4.4. Cultura de células

- Células HEK 293T foram cultivadas em DMEM + 5% FBS + 1% penicilina/estreptomicina (P/S) (Gibco, Grand Island, NY, EUA).
- As células HEPG2 foram cultivadas em MEM + 5% FBS + 1% P/S.
- As células REH foram cultivadas em RPMI 1640 GlutaMAX$^{TM}$ + 5% FBS + 1% P/S.

As células foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO2 e a cada 48 ou 72 horas o meio de cultura foi trocado.

Para as células em suspensão REH, as culturas celulares foram centrifugadas a 300 x *g* durante 3 minutos, o sobrenadante removido e adicionado meio de cultura fresco.

Para as células aderidas HEK 293T e HEPG2, o meio de cultura foi removido por aspiração e o meio fresco foi adicionado imediatamente. Quando a expansão e/ou contagem foi necessária, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM $Na_2HPO_4$; 1,8 mM $KH_2PO_4$) e, em seguida, uma solução de tripsina TripLE® Express (Gibco, Grand Island, NY, EUA) foi adicionada para dissociar as células aderidas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 300 x *g* por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e, em seguida, foi adicionado meio de cultura fresco.

A contagem de células foi realizada adicionando solução de Trypan Blue (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) em amostras de células que foram analisadas pelo Contador Automático de Células TC20™ (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA).

#### 2.3.4.5. Produção de partículas virais

Os plasmídeos construídos foram usados para gerar lentivírus por transfecção de células HEK 293T usando 3 µg de LGR + sgRNA, 2 µg de pPAX2 e 0,8 µg de pMD2.G misturados em 200 µL de Opit-MEM™ + 15 µL de Polietilenoimina (PEI) (Polyscience, EUA).

Um dia antes da transfecção, foram colhidas aproximadamente 7 x $10^5$ células HEK 293T por poço; no dia da transfecção, o meio foi removido e a mistura de plasmídeos (descrita acima) para produção de lentivírus foi adicionada às células com 1 mL de DMEM + 5% SFB e incubada a 37°C sob 5% CO2. Após 6 horas, o meio foi removido e 1 mL de meio DMEM fresco + 5% SFB + 10 mM HEPES + 1% P/S foram adicionados e incubados durante a noite e, em seguida, o meio de cultura foi trocado novamente. Após 24 horas, o meio foi coletado (contendo as partículas virais) e 1 mL de DMEM + 5% SFB + 10 mM HEPES + 1% P/S foi adicionado às células aderidas. As partículas virais foram coletadas a cada 24 horas por 3 dias.

#### 2.3.4.6. Infecção das células

Aproximadamente $10^5$ células (REHcas9 ou HEPG2cas9) por poço foram semeadas em placa de 12 poços em 200 µL de meio apropriado (RPMI 1640 ou MEM, respectivamente) e adicionado de 1 mL de lentivírus produzido, conforme descrito acima. A placa foi centrifugada a 1.000 x *g* por 25 minutos à temperatura ambiente. Para células REHcas9, após a etapa de centrifugação, as células foram ressuspendidas suavemente. As células foram

incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de $CO_2$ por 24 horas e então 1 mL de meio fresco foi adicionado. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido, meio fresco foi adicionado e as células foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de $CO_2$ por mais 24 horas. Para células REHcas9, a cultura de células foi centrifugada a 300 x *g* por 3 minutos para remover o meio. No terceiro dia de infecção, a expressão de GFP foi verificada em microscópio de fluorescência invertida Nikon eclipse Ti (Nikon, Minato, Tóquio, Japão) e a taxa de infecção foi monitorada por citometria de fluxo usando o instrumento MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha).

#### 2.3.4.7. Extração do DNA genômico e qPCR

As células foram ressuspensas em 3 volumes de PBS 1X gelado e centrifugadas a 500 x *g* à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido, ao precipitado foi adicionado de 3 volumes de Tampão de Lise (Tris 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; Dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS)) e o tubo foi invertido várias vezes. Em seguida, foram adicionados 5 µL de RNase A (10 mg/mL) e a reação incubada por 30 min a 65°C; em seguida, foram adicionados 3 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e incubados por 20 min a 40°C. Após a incubação, o volume foi completado para aproximadamente 400 µL com tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA), adicionado de 400 µL de fenol tamponado e agitado em vórtex por 1 min. A amostra foi transferida para a *pre-spin Lock-phase* e centrifugada a 12.000 x *g* por 5 min. A fase superior foi recolhida, foram adicionados 10% de volume de 3M acetato de sódio e 3 volumes de etanol 100% gelado. Após centrifugação a 12.000 x *g* por 5 min, o etanol foi removido e o DNA precipitado foi lavado com 700 µL de etanol 70% gelado. A amostra foi centrifugada e o etanol removido. O sedimento de DNA foi ressuspenso em 50 µL de 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e quantificado usando NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Os primers foram desenhados cobrindo a região alvo para o nocaute de cada sgRNA (tabela 2.2), a fim de validar a edição do gene CTSB por qPCR. Na reação de qPCR foram utilizados 200 ng do DNA genômico, 0,7 µM dos primers forward e reverso e 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), para um volume final de 10 µL em termociclador QuantStudio 12K Flex Real - Time PCR Sistema (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Tabela 2.2 – Iniciadores para qPCR: as sequências flanqueiam a região de edição do gene *CTSB*

| **Construção** | ***Forward* 5' → 3'** | ***Reverse* 5' → 3'** |
|---|---|---|
| LGR + sgRNA-1 | CCTGGTCTCTGATCTCTTTGATG | TGTGGGATCAGAGCTTGTAATG |
| LGR + sgRNA-2 | CAGACCCTGTCTGAAACTTGTA | TTCCACGCACCGATCAG |
| LGR + sgRNA-3 | CAGGGTCTCTCAGCACTAAAC | GGATCTGCATCCACACCAA |
| LGR + sgRNA-4 | CAGTAGGGTGTGCCATTCTC | CTCAGCCAGTTCTTCCCTTTT |
| LGR + sgRNA-5 | TCACAGATCTTGCTACACTTG | GTAGGTTGACTCCGCTTTCTC |

### 2.3.5. Confirmação da edição por análise da expressão da proteína CTSB nas células REHcas9 + sgRNAs e sequenciamento

#### 2.3.5.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

O gel de separação foi preparado usando tampão 470 mM Tris-HCl pH 8,8, 12% de acrilamida/bis-acrilamida, 0,1% de persulfato de amônio (PSA) e 10 µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED). No gel de empacotamento foram utilizados tampão 120 mM Tris-HCl pH 6,8, 4,5% acrilamida/bis-acrilamida, 2,3 mL de água, 0,1% de PSA e 10 µL de TEMED (LAEMMLI, 1970). A cada 10 µL de amostras de proteína foi adicionado 0,5 µL de ditiotreitol 1 M (DTT), 3,75 µL de tampão de amostra Laemmli 4X (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos em banho seco e aplicadas ao gel. O marcador de massa molecular utilizado foi *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). A eletroforese de proteínas foi realizada em tampão Tris-Glicina 1X (25 mM Tris; 192 mM glicina; 3,5 mM SDS) a 160 V. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Merck Millipore, Bellerica, MA, EUA) por 30 minutos sob leve agitação e descorado durante a noite com uma solução contendo 10% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 80% de água ultrapura.

#### 2.3.5.2. Western Blotting

As células foram ressuspensas com tampão de lise NP-40 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 5 mM EDTA), mantidas a 4°C sob agitação por 30 min, seguida de centrifugação a 15.000 x *g* por 20 min a 4°C (PATEL et al., 2009; VAN DER MEER et al., 2017). O sobrenadante foi recuperado e a quantidade de proteína total foi

medida pelo reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA); a curva padrão foi feita com concentrações conhecidas de Albumina de Soro Bovino (BSA – do inglês *Bovine Serum Albumin*). Quando necessário, o extrato proteico foi concentrado utilizando filtros Amicon® Ultra 3K (Merck Millipore, Bellerica, MA, EUA), a 7.500 x *g* pelo tempo necessário para aplicar a quantidade desejada de proteína no gel. Para amostras obtidas de células REH, até 150 µg de proteína total foi aplicado à eletroforese em gel, enquanto para amostras obtidas de células HEPG2, até 90 µg de proteína total foi usada.

A eletroforese foi realizada conforme descrito no item 2.3.5.1. A transferência foi realizada utilizando o kit *iBlotTM Transfer Stack* em membrana de PVDF de 0,4 µm (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) com o equipamento *iBlotTM Dry Blotting System* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) por 2 minutos.

Após a transferência, as membranas foram lavadas com 1X TBS-T (2,4 g Tris-Base; 8,8 g NaCl; 1 mL Tween-20; para 1 L de $H_2O$) três vezes por 10 min, bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado diluído em 1X TBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente e lavada uma vez com 1X TBS-T. Os anticorpos primários anti-catepsina B (#C6243 - Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) e anti-α-tubulina (#CP06 - Merck Millipore, Bellerica, MA, EUA), ambos de camundongo, foram adicionados nas diluições de 1:1000 e 1:5000, respectivamente, e as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente com 1X TBS-T e incubadas com anticorpo secundário conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP) anti-camundongo (diluído 1:15000) por 1 hora. O sinal HRP foi desenvolvido com substrato *Immobilon Crescendo Western HRP* (Merck Millipore, Bellerica, MA, EUA) em filme de raios X CL-XPosure (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

#### 2.3.5.3. Ensaio de atividade para catepsina B

- **Primeiro ensaio:** a atividade da enzima CTSB foi medida usando o *CTSB Activity Fluorometric Assay Kit* (BioVision, Waltham, MA, EUA). As células em cultura foram contadas usando Trypan Blue e $10^6$ células foram usadas em cada replicata, seguindo as instruções do fabricante. A reação foi incubada a 37°C por 90 minutos, e então a fluorescência foi medida com filtros de excitação de 400nm e emissão de 505nm em um espectrofluorímetro *EnVision Multimode Plate Reader* (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA).

- **Segundo ensaio:** as células em cultura foram contadas usando Trypan Blue (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) e $10^6$ células foram usadas para cada replicata. As células foram centrifugadas a 500 x *g* por 5 minutos e lavadas com PBS 1X e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 100 µL de reagente Bug Buster, mantidas sob leve agitação por 20 minutos e centrifugadas a 16.000 x *g* por 10 minutos; a fração sobrenadante foi recuperada.

No ensaio foi utilizado o substrato fluorescente para CTSB Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (Z-RR-AMC - Sigma-Aldrich #C5429) e o inibidor para CTSB CA-074 Methyl-ester (Sigma-Aldrich #C5857) como controle. A reação foi composta de 10 µL de tampão de ensaio 10X (500 mM Acetato de Sódio pH 5,2; 50 mM EDTA; 50 mM DTT), 33 µL de amostra (sobrenadante da lise celular descrito acima), 20 µM de substrato Z-RR-AMC, e água para o volume final de 100 µL. Para o branco não foi adicionado o extrato celular à reação; como controle, a reação foi feita sem substrato. Para a o controle negativo foi adicionado 10 µM do inibidor CA-074 Methyl-ester à reação. A reação foi incubada a 37 °C por 90 minutos e, em seguida, a fluorescência foi medida com excitação de 400nm e filtros de emissão de 505nm em espectrofluorímetro (Spectra Max M2 – Molecular Devices) (MCGLINCHEY; LEE, 2015).

#### 2.3.5.4. Clonagem no vetor TOPO para confirmação da edição do gene *CTSB* por sequenciamento

O DNA genômico extraído das células REHcas9 + sgRNA-1, 2 e 4 foram utilizados como molde para amplificar as regiões do gene *CTSB,* utilizando os iniciadores descritos na tabela 2.2 para os sgRNA-1 e sgRNA-4, e os iniciadores *forward* 5’ CAGACCCTGTCTGAAACTTGTA3’ e *reverse* 5’GGTTGACCCTTGTCACACTT3’ para o sgRNA-2, e clonados no vetor TOPO, utilizando o TOPO®TA *Cloning Kit* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os clones foram selecionados em meio contendo ampicilina e 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil β-D-Galactopiranosídeo (*X*-gal) e, em seguida, cultivados em meio LB para posterior extração do plasmídeo, conforme descrito no item 2.3.4.1. Os plasmídeos foram quantificados por NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 1,0 µg de cada construção e 5 µM de primer M13 (*forward* 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' e *reverse* 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3) foram

enviados para sequenciamento na *Cold Spring Harbor Laboratory's DNA Sequencing Facility.*

### 2.3.6. Obtenção das enzimas ASNases

A construção para expressão das enzimas ASNases foi realizada no Brasil dentro do projeto de doutorado e levada a CSHL para expressão e purificação.

- ASNase tipo selvagem de *E. coli* (EcA-WT);
- ASNase tipo selvagem de *D. chrysanthemi* (ErA-WT);
- ASNase dupla mutante (Q227E/V272M) de *D. chrysanthemi* (ErA-DM);

#### 2.3.6.1. Expressão de ASNases em *E. coli* BL21(DE3)

Inicialmente, clones transformadores de *E. coli* BL21(DE3) foram inoculados em meio LB com 50 µg/mL de carbenicilina e cultivados durante a noite a 37ºC com agitação de 180 r.p.m. Posteriormente, as células foram diluídas para $DO_{600nm}$ 0,2 em meio LB + 50 µg/mL de carbenicilina e incubadas a 37°C com agitação a 250 r.p.m até $DO_{600nm}$ 1,0. Em seguida, o isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado para induzir a expressão de ASNase. Para ErA-WT e ErA-DM, a indução foi realizada por 22 horas a 37ºC sob agitação de 180 r.p.m com a concentração final de 0,1 mM de IPTG. Para a ASNase EcA-WT, a indução foi realizada por 16 horas a 37ºC sob agitação de 180 r.p.m com concentração final de 0,5 mM de IPTG. Após o período de indução, as células foram decantadas por centrifugação a 4.000 x *g* por 20 minutos a 4°C e o sedimento obtido foi armazenado a -20°C.

#### 2.3.6.2. Choque osmótico

Os pellets de células bacterianas obtidos após a expressão de ASNases foram submetidos a choque osmótico para obtenção da fração periplasmática, utilizando o protocolo adaptado de Harms (1991). Resumidamente, 200 mL de tampão hiperosmótico gelado (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 500 mM sacarose, 0,5 mM EDTA) foram adicionados ao sedimento celular obtido a partir de 1 L de cultura. As células foram ressuspensas e mantidas em gelo por 5 minutos e centrifugadas a 4.000 x *g* por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em solução aquosa de 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (30 mL para o pellet de células obtido a partir de 1 L de cultura),

mantidas em gelo por 5 minutos e centrifugadas a 4.000 x *g* por 40 minutos a 4°C. A fração sobrenadante foi coletada para purificação (HARMS et al., 1991).

#### 2.3.6.3. Purificação de proteínas

A purificação das ASNases foi realizada em duas etapas cromatográficas utilizando o *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) AKTA Purifier 100 (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EUA), o equipamento foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Hiro Furukawa – CSHL.

- **Etapa 1- Troca iônica**

Para as enzimas ErA-WT e ErA-DM foi utilizado a cromatografia de troca catiônica com coluna HiTrap HP FF 5 mL (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EUA) - A purificação foi realizada a um fluxo constante de 0,7 mL/min. A coluna foi equilibrada com 20 mM de fosfato de potássio pH 5,8 (5 volumes de coluna (VC)) e ativada com 5 VC de 20 mM fosfato de potássio pH 5,8 + 1 M NaCl, seguido de aplicação da amostra de extrato de proteína, lavagem da coluna com 20 mM de fosfato de potássio pH 5,8 (5 VC) e seguida de uma segunda lavagem com 20 mM de fosfato de potássio pH 6,6 (5 VC); a amostra foi eluida em fluxo isocrático com de 20 mM de fosfato de potássio pH 8,0 (COSTA et al., 2022).

Para a enzima EcA-WT foi utilizado a cromatografia de troca aniônica usando coluna HiTrap DEAE FF 5 mL (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EUA) - A purificação foi realizada a um fluxo constante de 0,7 mL/min. A coluna foi equilibrada com 50 mM de Tris-HCl pH 8,8 (5 VC), ativada com 5 VC de 50 mM de Tris-HCl pH 8,8 + 1 M NaCl seguido de aplicação de amostra de extrato de proteína e lavagem da coluna com 50 mM de Tris-HCl pH 8,8 (5 VC); a amostra foi eluída em um gradiente linear de 0 a 100% com 50 mM de Tris-HCl pH 8,8 + 500 mM de NaCl (10 VC) (RODRIGUES et al., 2020).

- **Etapa 2- Cromatografia de exclusão molecular**

As amostras com atividade ASNase obtidas nas etapas cromatográficas anteriores foram concentradas utilizando filtros Amicon® Ultra MWCO 30 kDa (Merck Millipore, Bellerica, MA, EUA), a 4.000 x *g* a 4ºC até atingir o volume de 0,5 mL, utilizado em cada aplicação de amostra na cromatografia de exclusão molecular. A coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EUA) foi utilizada em um fluxo isocrático de 0,4 mL/min, em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 + 100 mM de Glicina

para enzima EcA-WT e 20 mM de fosfato de potássio pH 8,0 + 100 mM de Glicina para as enzimas ErA-WT e ErA-DM. Frações de 0,5 mL foram coletadas ao longo da corrida para verificar a presença de ASNase e a pureza das amostras foi analisada por eletroforese em gel SDS-PAGE, conforme descrito no item 2.3.5.1.

#### 2.3.6.4. Quantificação de proteínas

As proteínas purificadas foram concentradas através de ultrafiltração de membrana usando filtros Amicon® Ultra MWCO 30 kDa (Merck Millipore, Bellerica, MA, EUA). Após concentração, as proteínas foram quantificadas em 280nm seguindo a lei de Lambert-Beer. A determinação do coeficiente de absortividade molar (ε) foi calculada pelo programa de bioinformática *ProtParam* usando as sequencias primárias das referidas proteínas em sua forma madura (https://web.expasy.org/protparam/).

ErA-WT e ErA-DM: $\varepsilon = 19.370\ M^{-1}.cm^{-1}$

EcA-WT: $\varepsilon = 23.505\ M^{-1}.cm^{-1}$

#### 2.3.6.5. Determinação da atividade específica das ASNases

O ensaio de atividade específica para ASNase foi realizado em microplacas de 96 poços usando tampão 50 mM de fosfato de potássio pH 8,0 para ErA-WT e ErA-DM ou 50 mM de Tris-HCl pH 8,8 para EcA-WT e L-asparagina 20 mM (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA). A concentração da enzima variou de 5 a 50 nM para ErA-WT e ErA-DM e de 30 a 200 nM para a enzima EcA-WT. A reação (340 µL) foi incubada a 37°C por 10 min e interrompida com 20 µL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) (IMADA et al., 1973; PRADHAN et al., 2013). A reação foi diluída 10 X em água, adicionado de 34 µL de Reagente de Nessler (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA), em volume final de 340 µL. O branco do ensaio, contendo todos os reagentes exceto o substrato (L-asparagina ou L-glutamina), e o controle negativo, contendo todos os reagentes exceto a enzima, foram incubados nas mesmas condições da reação descrita acima. As absorbâncias do branco e do controle negativo foram medidas e o maior valor foi descontado da reação. A leitura de absorbância foi realizada a 440nm em um espectrofotômetro *EnVision Multimode Plate Reader* (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). A curva padrão foi feita com concentrações conhecidas de sulfato de amônio nas mesmas condições dos testes.

### 2.3.7. Ensaio de viabilidade celular/citotoxicidade

Para monitorar o efeito de diferentes ASNases (EcA_WT; ErA_WT; ErA_DM) na viabilidade celular, as células REHcas9 + sgRNA-1, sgRNA-2, sgRNA-4 e os controles REH WT (sem cas9) e células REHcas9 + sgRNA-Rose26 foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços.

- **Viabilidade por fluorescência:** $5x10^3$ células foram semeadas em cada poço com diferentes concentrações de ASNases (de 0,05 a 2 U/mL) no volume final de 150 µL e mantidas em atmosfera umidificada a 37 °C sob 5% de $CO_2$ por 72 h. Após 72h, 15 µL de reagente de viabilidade celular AlamarBlue™ (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) foram adicionados a cada poço. Após 24 h de incubação, a fluorescência foi medida com uma excitação de 570nm e filtros de emissão de 585nm em um espectrofluorímetro *EnVision Multimode Plate Reader* (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA).

- **Viabilidade por colorimetria:** $2x10^4$ células foram semeadas em 150 µL de meio de cultivo em cada poço com diferentes concentrações de ASNases (de 0,01 a 1 U/mL); as placas foram incubadas a 37°C com 5% de $CO_2$ por 24 ou 48 horas. Após a incubação, foi adicionado 0,5 mg/mL de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) diluído em PBS 1X e a placa foi incubada a 37°C com 5% de $CO_2$ por 3 horas. Para solubilização dos cristais formados foi adicionado 150 µL de uma solução de 10 mM de ácido clorídrico + 10% SDS, e incubado overnight a 37°C com 5% de $CO_2$. Em seguida, a absorbância foi mediada a 570nm em espectrofotômetro (Spectra Max M2 – Molecular Devices).

## 2.4.RESULTADOS

### 2.4.1. Construção das células REH *knockout* para a proteína CTSB

Em conjunto com a construção LGR + sgRNA para o gene *CTSB*, usamos dois controles para infecção celular: LGR + sgRNA-Rosa26 (controle negativo) e LGR + sgRNA-RPA3 (controle positivo). Ambos os controles foram previamente construídos pelo grupo da Professora Dra. Camila O. dos Santos - CSHL. Esses genes foram escolhidos como controles

internos porque o *locus Rosa26* codifica um RNA não essencial em camundongos e não está presente em células humanas (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14910), enquanto *RPA3* (*Replication Protein A3*) desempenha um papel essencial na replicação do DNA e na resposta celular ao dano do DNA em células humanas (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RPA3&keywords=RPA3).

A figura 2.1A mostra a confirmação da extração dos plasmídeos LGR + sgRNA clones de 1 a 5, incluindo os controles internos, e a figura 2.1B mostra a análise do sequenciamento confirmando a ligação correta no plasmídeo LGR e ausência de mutações. Esses cinco clones, com diferentes sgRNA para *CTSB*, e os controles representados na figura 2.1, foram selecionados para a produção das partículas virais.

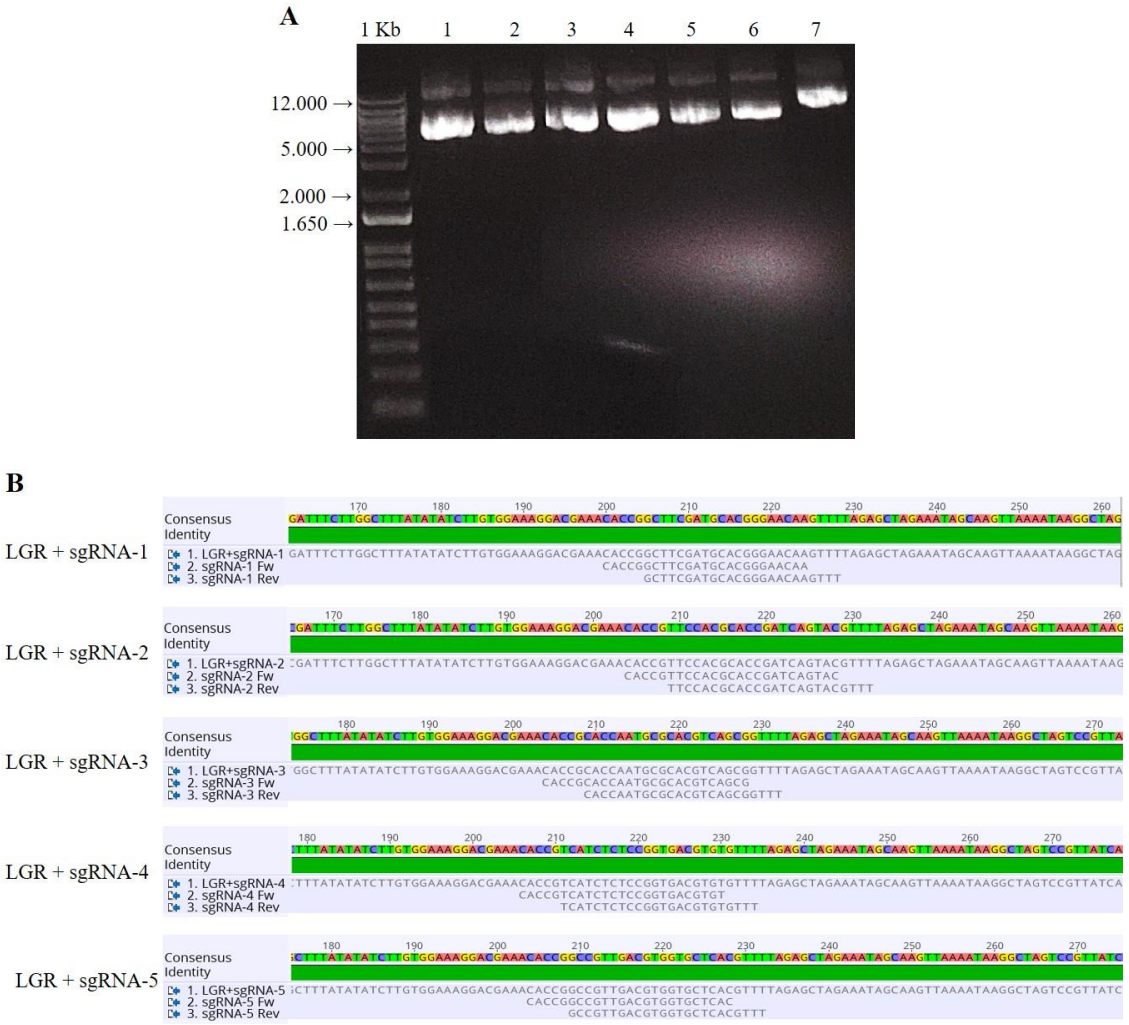
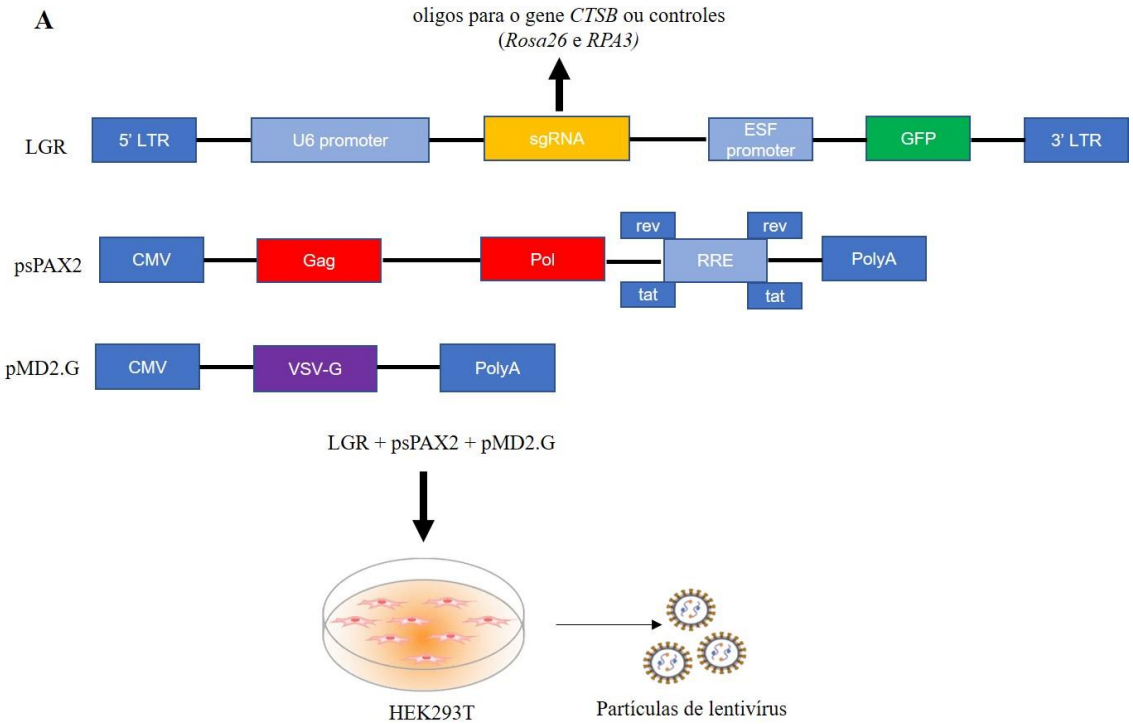



Figura 2.1 - Validação das construções LGR + sgRNA-1 a 5 para o *knockout* do gene *CTSB*. A- Eletroforese em gel de agarose 1,0% após a extração dos plasmídeos LGR + sgRNA. A primeira amostra é o padrão de pares de bases *1 Kb plus DNA ladder* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA); as amostras 1 a 5 são as construções usando os oligos sgRNA 1 a 5 listados na tabela 2.1; as amostras 6 e 7 são os plasmídeos LGR + sgRNA-Rosa26 e LGR + sgRNA-RPA3, respectivamente. B - Análise do sequenciamento de construção LGR + sgRNA-1 a 5. Os oligos que codificam sgRNA *forward* e *reverse* foram alinhados à construção sequenciada de LGR + sgRNA usando o *software* Geneious® 11.1.5.

As partículas virais foram produzidas por transfecção das células empacotadoras HEK293T utilizando os plasmídeos LGR + sgRNA-1 a 5 para edição do gene *CTSB*, LGR + sgRNA-Rosa26 e LGR + sgRNA-RPA3, psPAX2 e pMD2.G. A representação esquemática do processo de transfecção na figura 2.2A destaca as principais estruturas de cada plasmídeo para a produção de partículas de lentivírus. O processo de transfecção foi acompanhado pela expressão de GFP (figura 2.2B).



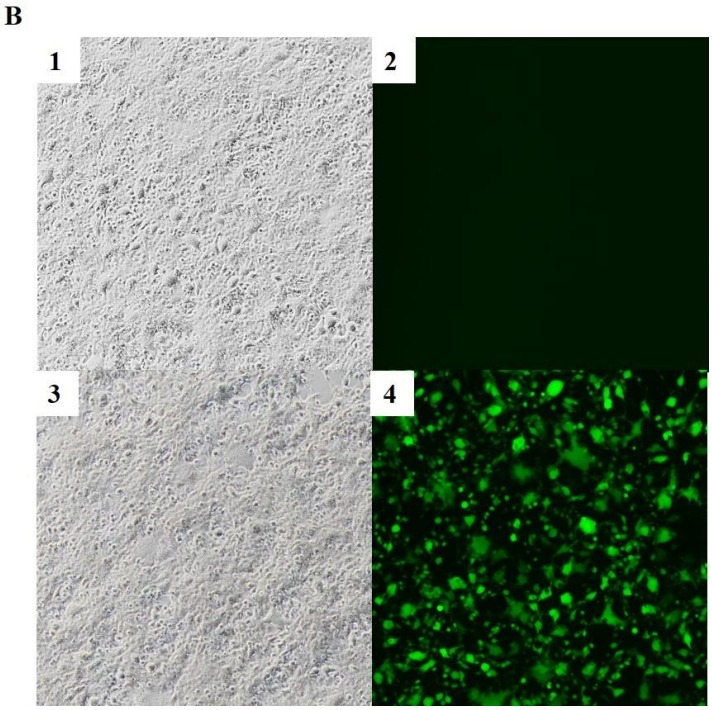



Figura 2.2 - Produção de partículas de lentivírus por transfecção usando as células HEK293T. A- Representação esquemática da transfecção: plasmídeo de transferência LGR com a sequência de sgRNA representada em amarelo e a proteína GFP em verde; plasmídeo de empacotamento psPAX2 com o gene *Gag* codifica proteínas estruturais do lentivírus; gene *Pol* que codifica a transcriptase reversa; RNAse H e integrase, ambos em vermelho; envelope plasmídico pMD2.G com o gene *VSV-G* que codifica glicoproteínas de superfície que determinam os tropismos virais. B - Imagem representativa da transfecção HEK293T usando LGR + sgRNA-Rosa26. O mesmo procedimento foi realizado para todos os LGR construídos (sgRNA-1 a 5 para o gene CTSB e sgRNA-RPA3). A produção de lentivírus foi confirmada pela expressão de GFP em microscópio de fluorescência invertida. Células não transfectadas sob luz branca (1) e luz UV (2); e células transfectadas por LGR+sgRNA_Rosa26 expressando GFP sob luz branca (3) e luz UV (4).

Em seguida, os sete lentivírus produzidos foram usados para infectar as células REHcas9. Nos primeiros três dias, a infecção foi monitorada pela expressão de GFP usando microscópio de fluorescência invertida (figura 2.3). Subsequentemente, a taxa de infecção foi monitorada durante 27 dias pela expressão de GFP por citometria de fluxo (figura 2.4A). Com aproximadamente 90% das células infectadas, confirmamos que a partícula viral foi integrada ao genoma das células REHcas9, e que os sgRNA-1 a 5 para o gene alvo CTSB não prejudicam o crescimento das células. Isso é observado devido à manutenção da porcentagem de células infectadas, bem como para o controle sgRNA-Rosa26, e pelo controle com sgRNA-RPA3, onde se observa a diminuição da taxa de infecção ao longo do tempo. Isso ocorre porque o *RPA3* é um gene essencial e sua deleção leva à morte celular, sendo que ao final de 27 dias a porcentagem de células infectadas foi aproximadamente zero.

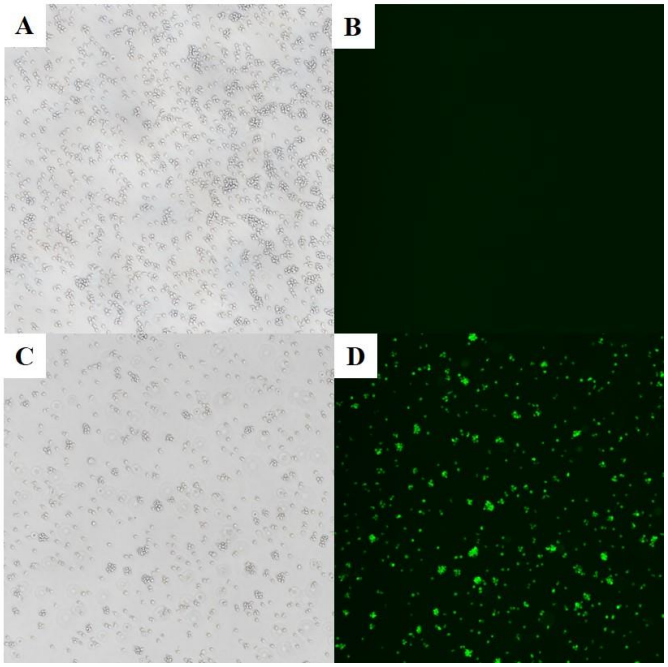



Figura 2.3 - Imagem representativa da infecção das células REHcas9 usando partículas de lentivírus sgRNA-Rosa26. O mesmo procedimento foi realizado para todos os lentivírus produzidos (sgRNA-1 a 5 para o gene *CTSB* e sgRNA-RPA3). A infecção foi confirmada pela expressão de GFP em microscópio de fluorescência invertida. A figura mostra as células não infectadas sob luz branca (A) e luz UV (B); e células infectadas com lentivírus sgRNA_Rosa26 expressando GFP sob luz branca (C) e luz UV (D).

Após 27 dias, as células foram triadas por FACS para obter 100% de células infectadas e, assim, eliminar a interferência de células não infectadas que expressariam a proteína CTSB. As células triadas foram monitoradas em cultura até atingirem a confluência e, a taxa de infecção foi confirmada por citometria de fluxo (figura 2.4B). Estas células foram utilizadas para todos os ensaios seguintes.

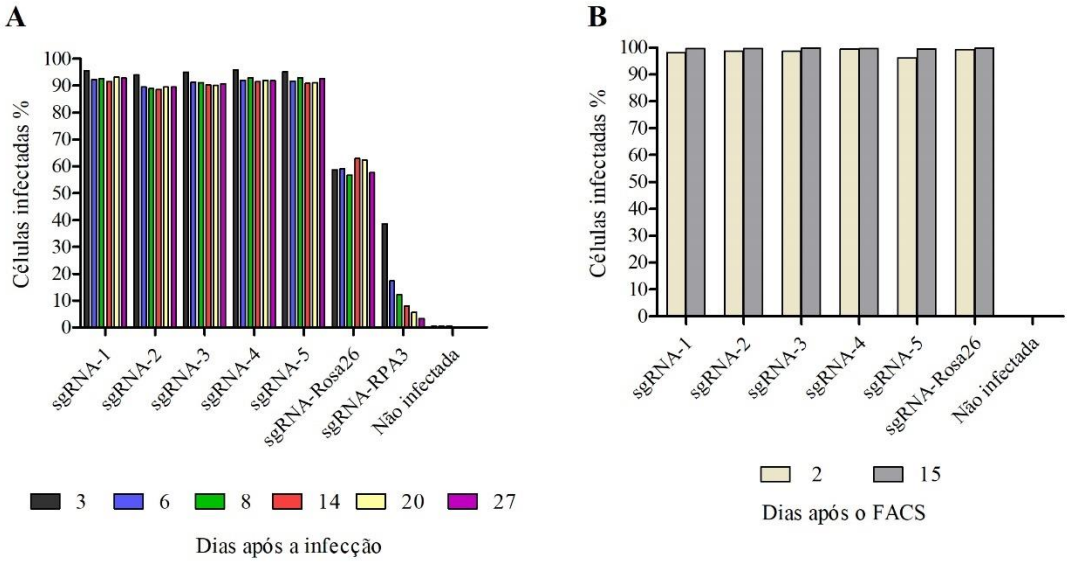



Figura 2.4 - Taxa de infecção das células REHcas9 monitoradas ao longo dos dias. A - Células infectadas com diferentes sgRNAs foram monitoradas por citometria de fluxo ao longo de 27 dias. B - Após 27 dias, as células foram separadas por *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) e, posteriormente, monitoradas por 15 dias.

Para verificar a edição do gene *CTSB* nas células REHcas9, o DNA genômico dessas células foi extraído e a qPCR foi realizada com primers flanqueando as regiões alvo dos sgRNAs (figura 2.5A). Alterações na sequência de bases (inserção, mutação ou deleção) podem alterar o perfil de dissociação do DNA durante o aumento da temperatura e, consequentemente, a curva de dissociação. Dessa forma, é possível avaliar se houve edição no gene *CTSB* para os diferentes sgRNAs por meio de alterações na curva de dissociação. Como controle do ensaio utilizamos os primers para o gene quinase 7 dependente de ciclina (*CDK7),* mostrando que em todas as células analisadas a curva de dissociação é a mesma para este gene.

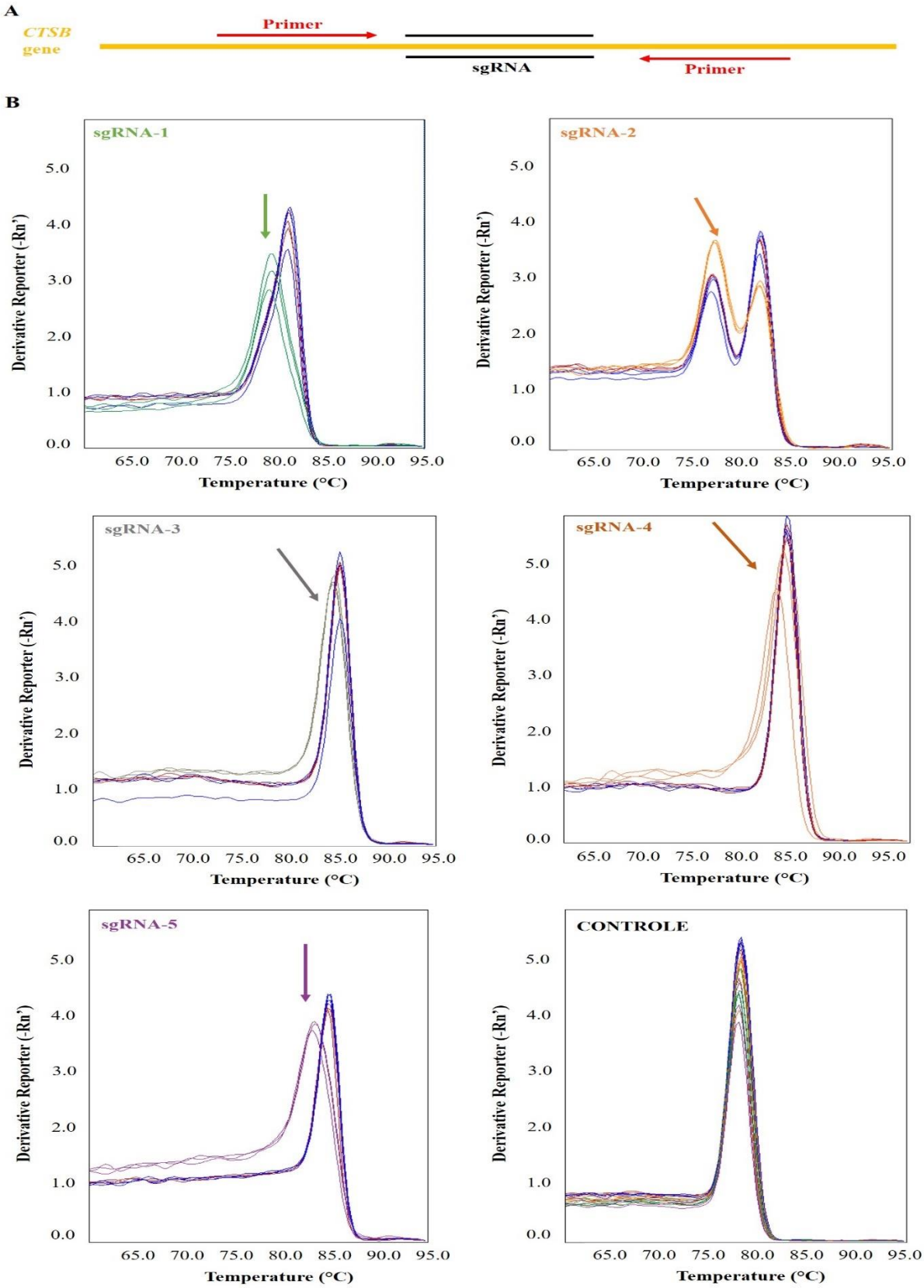



Figura 2.5 - Confirmação da edição do gene *CTSB* por qPCR. A - Representação esquemática dos *primers* específicos para o gene *CTSB* desenhados para flanquear a região de cada sgRNA (1 a 5). B - Curvas de dissociação do qPCR de células REHcas9 infectadas com diferentes sgRNAs. O DNA genômico de cada linhagem celular foi usado para validação da edição do gene *CTSB*. O *primer* específico para o gene *CDK7* foi utilizado como controle interno da reação de qPCR, representado pelo quadro CONTROLE.

Comparamos as curvas de dissociação dos controles, células REHcas9 não infectadas e células REHcas9 + sgRNA-Rosa26 com a curva obtida de células infectadas com os diferentes sgRNAs que visavam a edição do gene *CTSB* (figura 2.5B). Os gráficos mostram que as curvas de dissociação das células infectadas com sgRNA-1, 3, 4 e 5 apresentaram picos de temperatura diferentes quando comparadas aos controles, indicando que houve edição no gene *CTSB* das células REHcas9 transformadas.

No entanto, para o sgRNA-2, a curva de dissociação se sobrepõe aos controles, indicativo de que não houve edição ou de que a edição não foi suficiente para causar alterações na curva. A presença de dois picos indica que os iniciadores utilizados anelaram em duas regiões do genoma.

### 2.4.2. Confirmação do *knockout* da proteína CTSB

Para confirmar a eficiência dos sgRNAs no *knockout* da proteína CTSB avaliamos a expressão/função da proteína por meio do ensaio de *western blotting* para ver a presença e quantidade de CTSB, e pelo ensaio de atividade da proteína CTSB. No entanto, encontramos dificuldade em visualizar a proteína CTSB nas células controle REHcas9 por *Western blotting* (anexo H).

Para validar nossos ensaios e estabelecer um protocolo para verificação da presença da proteína, avaliamos a presença da proteína CTSB nas células REH WT, sem a presença da proteína cas9, para verificar se essa modificação estaria ocasionando alterações que implicassem na redução da expressão da CSTB. Além disso, passamos a utilizar as células de hepatocarcinoma humano HEPG2 como controle.

As células HEPG2 foram escolhidas, pois expressam níveis maiores de *CTSB* do que as células REH (https://www.proteinatlas.org/ENSG00000164733-CTSB/cell); dessa forma seria mais fácil confirmar a eficiência dos sgRNAs no *knockout* da proteína CTSB. Essa diferença no nível de expressão da CTSB foi confirmada por *Western blotting* utilizando as células REH WT e HEPG2 WT, validando que a baixa expressão nas células REHcas9 não é consequência da inserção da proteína cas9 (anexo H).

Deste modo, para utilizar essas células como controle, nós realizamos a infecção das células HEPG2cas9 com os sgRNAs-1 a 5 e os controles. As partículas de lentivírus foram produzidos novamente, como feito para células REHcas9, e usadas para infectar células HEPG2cas9 (figura 2.6A-D). Após 15 dias, com taxa de infecção de aproximadamente 70 - 80%, conforme mostrado no gráfico da figura 2.6E, as células HEPG2cas9 + sgRNAs foram

utilizadas para verificar o efeito da edição gênica na proteína CTSB pela técnica de w*estern blotting* e ensaio de atividade enzimática juntamente com as células REHcas9 + sgRNAs.

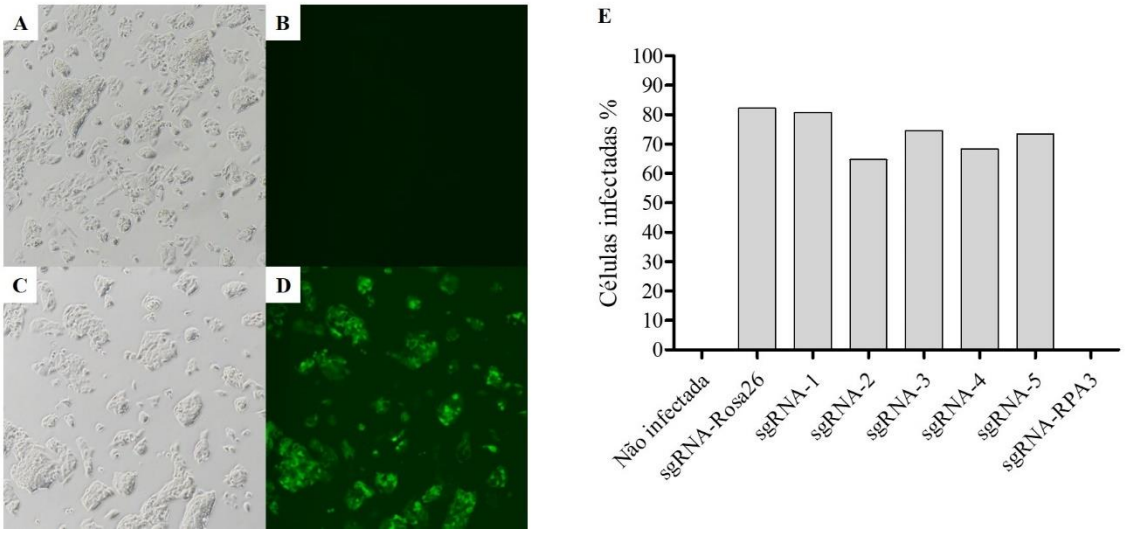



Figura 2.6 - Infecção de células HEPG2cas9 usando partículas de lentivírus para avaliar a eficiência de edição dos oligos sgRNA1-5. As células foram infectadas usando os sete lentivírus diferentes. A infecção foi confirmada pela expressão de GFP observada em microscópio de fluorescência invertida. A figura representa as células não infectadas sob luz branca (A) e luz UV (B); e células infectadas com lentivírus sgRNA_Rosa26 expressando GFP sob luz branca (C) e luz UV (D). A taxa de infecção de células HEPG2cas9 monitoradas ao longo dos dias pela expressão de GFP usando citometria de fluxo (E).

Com o ensaio de *western blotting* nós avaliamos a expressão da proteína CTSB com ~37 kDa (pró-proteína) e com ~30 kDa (proteína madura), e da proteína α-tubulina (60 kDa) como controle do ensaio. Desta forma foi possível detectar a presença da proteína CTSB nos controles de células REHcas9, REHcas9 + sgRNA-Rosa26 e na amostra REHcas9 + sgRNA-2. No entanto, a ausência da proteína foi confirmada para sgRNA-1, 3, 4 e 5 (figura 2.7A).

Para as células HEPG2cas9 (figura 2.7B), o resultado sugere que o sgRNA-1 foi o mais eficiente, uma vez que a presença de CTSB não foi detectável. Para as amostras de sgRNA-3, 4 e 5 é possível visualizar uma banda com menor intensidade que os controles não infectados HEPG2 WT e HEPG2cas9 + sgRNA-Rosa26; entretanto, a presença da proteína pode ser resultado da expressão de CTSB pelas células não infectadas presentes nas amostras, uma vez que essas células não foram separadas por FACS como realizado para REH. A amostra HEPG2cas9 + sgRNA-2 apresentou uma banda semelhante aos controles, sugerindo que não houve deleção da proteína. Portanto, mesmo com aproximadamente 20% de células não infectadas, foi possível validar o *knockout* da proteína CTSB nas células HEPG2, confirmando o resultado obtido para as células REH.

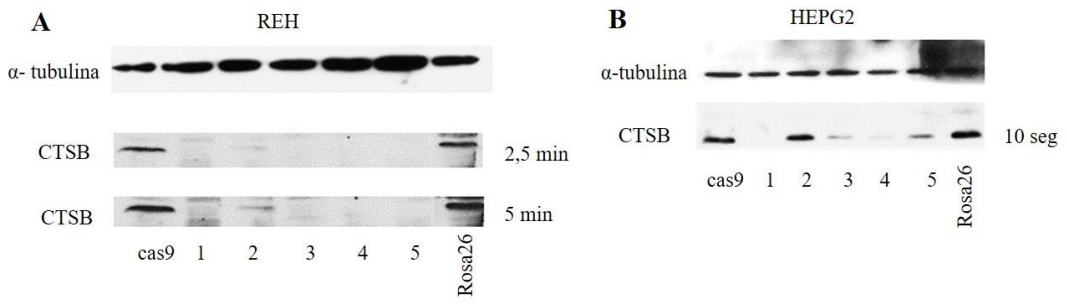



Figura 2.7 - *Western blotting* usando REHcas9 + sgRNAs e HEPG2cas9 + sgRNAs. A - Células REHcas9 e REHcas9 + sgRNAs (1 a 5 e Rosa26) foram lisadas e 150 µg de proteína total foram usados para cada amostra e o filme foi exposto por 2,5 e 5 minutos. B – HEPG2cas9 e HEPG2cas9 + sgRNAs (1 a 5 e Rosa26) foram lisados e 50 µg de proteína total foram usados para cada amostra e o filme foi exposto por 10 segundos. Para todas as análises, a proteína α-tubulina (60 kDa) foi usada como controle. Cas9 representa as células não infectadas com os sgRNAs.

Como segunda confirmação, medimos a atividade de CTSB por fluorescência. A mesma quantidade de células, REHcas9 + sgRNAs e HEPG2cas9 + sgRNAs foram utilizadas no ensaio. Também avaliamos a atividade enzimática nas células REH WT, sem a presença da proteína cas9, a qual apresentou a mesma atividade CTSB do que as células REHcas9.

O ensaio enzimático mostra que as células HEPG2 têm uma atividade aproximadamente dez vezes maior do que a linhagem celular REH, reforçando a suposição de que o gene *CTSB* não é superexpresso pelas células REH utilizadas nesse trabalho e sob essas condições de cultivo. Assim, avaliando a atividade para os clones *knockout*, verificamos que, tanto para a célula REH quanto para a célula HEPG2, houve uma redução estatisticamente significante na atividade quando comparada às células não infectadas (figura 2.8A e B).

Comparando as amostras REHcas9 + sgRNA_1 - 5 com o REHcas9 não infectado, é possível observar uma redução significativa na atividade enzimática ($P < 0,05$). O mesmo perfil foi observado para células HEPG2cas9 + sgRNA-1, 4 e 5 quando comparadas às células não infectadas. As células HEPG2cas9 + sgRNA-2 e 3 apresentam uma redução significativa na atividade, mas não são tão expressivas quanto as células que possuem os outros sgRNAs (figura 2.8A e B).

Como ainda foi possível detectar atividade nos clones infectados, utilizamos outra marca de reagente para mensurar a atividade da enzima também por fluorescência. Para isso, selecionamos somente os clones controles (REHcas9 e sgRNA-Rosa26), os dois clones com maior redução na atividade (sgRNA-1 e sgRNA-4) e o clone que apresentou menor redução de atividade (sgRNA-2). Utilizando esses novos reagentes confirmamos a redução significativa na atividade dos clones sgRNA-1 e sgRNA-4 em relação aos controles, entretanto o clone sgRNA-2 não apresentou diferença na atividade CTSB (figura 2.8C).

Quando comparamos as atividades das células infectadas com os sgRNAs com as células tratadas com o inibidor da CTSB, observamos que somente as células infectas com os sgRNA-1 e sgRNA-4 não apresentaram diferença significativa nos três ensaios.

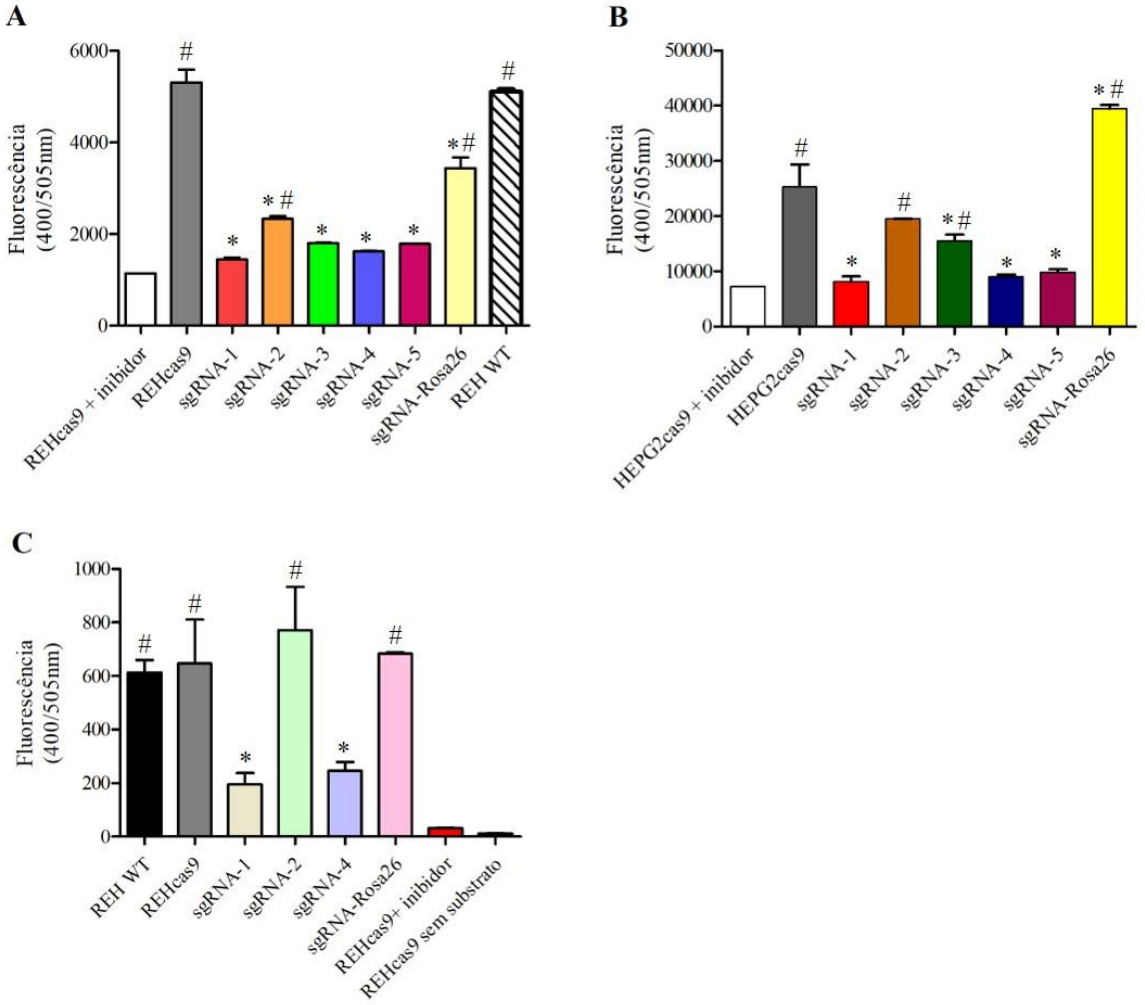



Figura 2.8 - Ensaio de atividade da catepsina B das células não infectadas e infectadas com sgRNAs (1 a 5) e Rosa26. Células REH (A) e células HEPG2 (B). O inibidor é específico para CTSB e vem com o Kit *Cathepsin B Activity Fluorometric Assay* (BioVision, Waltham, MA, EUA). C – Ensaio de atividade para CTSB utilizando reagentes da Sigma-Aldrich (materiais e métodos item 2.3.5.3) para lisados das células REHcas9 e das células infectadas com os sgRNAs-1, 2, 4 e Rosa26. Os resultados representam a média ± erro padrão dos experimentos feitos em triplicata. A análise estatística *One Way ANOVA* seguido de Turkey *post hoc* teste mostra uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre as atividades CTSB das células infectadas com sgRNA (1 a 5) quando comparadas com o controle não infectado REHcas9 ou HEPG2cas9 (*) ou quando comparadas com as células tratadas com inibidor para CTSB (#).

Os resultados da atividade corroboram com os dados de *western blotting*, e assim concluímos que os sgRNAs projetados foram eficientes na edição do gene, resultando no *knockout* da proteína. Comparando os resultados obtidos das células REH e HEPG2, selecionamos três clones para dar continuidade aos ensaios: os clones REHcas9 + sgRNA-1 e sgRNA-4 por apresentarem a maior diminuição de CTSB no *western blotting* e redução superior na atividade enzimática; o clone REHcas9 + sgRNA-2 foi escolhido como controle por apresentar maior atividade CTSB e presença de proteína no w*estern blotting.*

Para confirmar a edição no gene *CTSB*, preparamos as amostras para sequenciamento. O DNA genômico extraído das células REHcas9 + sgRNA-1, sgRNA-2 e sgRNA-4 foi amplificado com primers específicos (figura 2.9A), os mesmos utilizados para qPCR, e então o produto da PCR foi clonado no vetor TOPO.

Após selecionar clones bacterianos usando X-gal em meio LB sólido, o plasmídeo de dois clones isolados obtidos de cada construção TOPO + PCR foi extraído (figura 2.9B) e sequenciado (figura 2.9C). Para os clones sgRNA-1 e 2 foi identificada a inserção de quatro bases; já para o clone sgRNA-4 o sequenciamento mostra a inserção de três bases nitrogenadas AAG.

A análise da sequência do DNA e da proteína após a edição mostrou que a inserção de bases mudou o quadro de leitura do DNA, alterando a sequência de aminoácidos da proteína. Para o sgRNA-1 a inserção das quatro bases alterou o quadro de leitura resultando não só na alteração dos aminoácidos a partir do resíduo 89, mas também na transcrição de um códon de parada (TGA) na posição 120, impedindo a transcrição dos aminoácidos seguintes; o sgRNA-2 também alterou na sequência de aminoácidos a partir da posição 335; já o sgRNA-4 inseriu as bases AAG no meio da trinca CAC, resultando na alteração de dois aminoácidos na sequência da proteína (tabela 2.3). A sequência completa da transcrição após a edição dos três sgRNAs pode ser conferida no anexo I.

A proteína CTSB é constituída por uma sequência peptídeo sinal, seguida de um propeptídeo que precede a proteína madura, e outro propeptídeo no C-terminal da proteína. As edições do sgRNA-1 e 4 promoveram inserções na proteína madura; já a mudança ocasionada pelo sgRNA-2 está localizada no propeptídeo final da proteína, o qual é clivado durante o processo de maturação da proteína (figura 2.10).

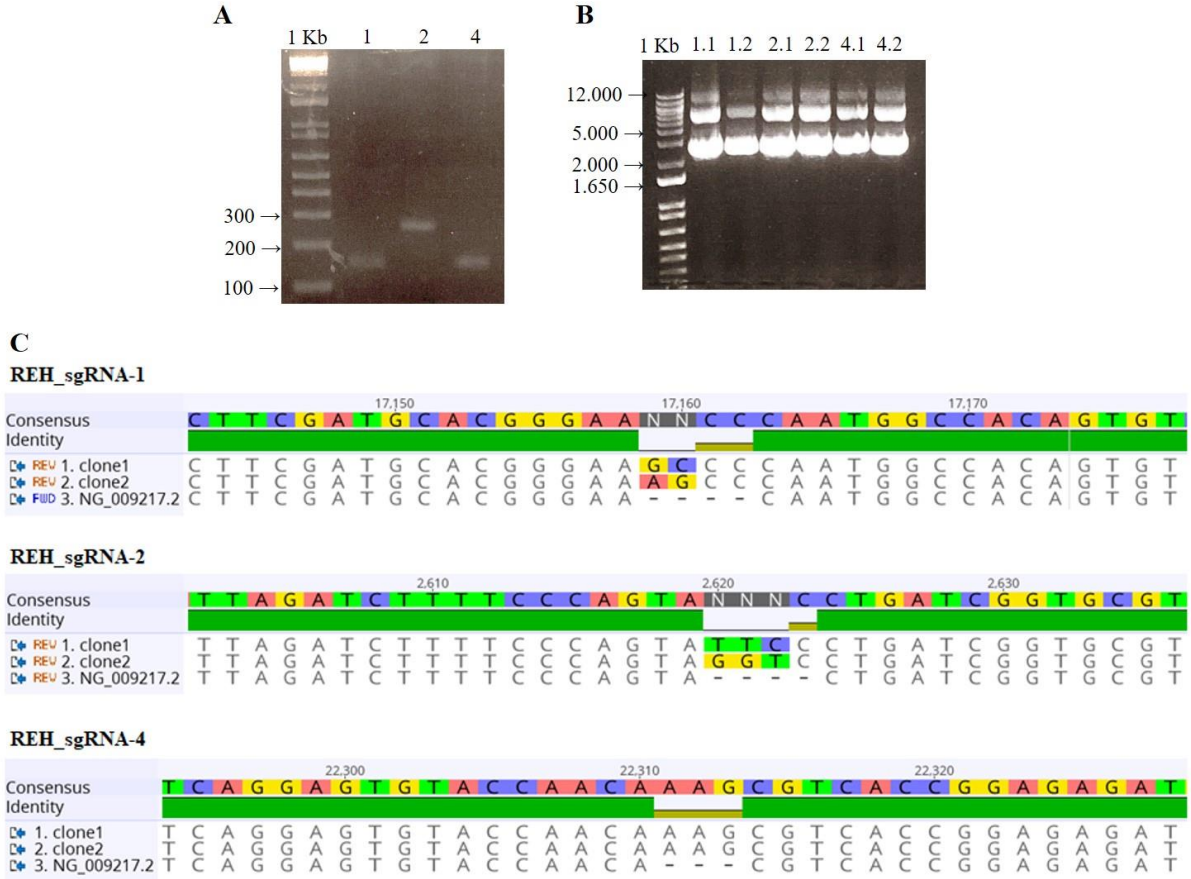



Figura 2.9 – Análise da edição do gene *CTSB* em células REHcas9 por sequenciamento. A- Imagem de eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do DNA genômico (gDNA) das células infectadas com primers específicos para o gene *CTSB* que flanqueiam a região alvo do sgRNA. Os números de 1, 2 e 4 representam os produtos de PCR obtidos usando como molde gDNA extraído das células REHcas9 + sgRNA-1, 2 e 4, respectivamente. B- Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídeos extraídos dos clones bacterianos selecionados por X-gal transformados com as construções TOPO + PCR. O primeiro número de amostras representa o produto de PCR clonado no vetor TOPO e o segundo número é o clone selecionado por X-gal. C- Análise de edição de genes por sequenciamento. Os plasmídeos obtidos a partir das construções TOPO + PCR foram sequenciados usando o primer do vetor TOPO M13 e alinhados com a sequência do gene *CTSB* (NG_009217.2) usando o software Geneious® 11.1.5.

Tabela 2.3 – Análise das edições na sequência de DNA e da proteína

| Amostra | DNA | | | Proteína | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Posição da edição*** | **Bases inseridas** | **Alteração no *Frame*** | **AAs alterados** | **Primeiro AA aletrado** | **Códon de parada** |
| sgRNA-1 | 265 | GGCC ou AGCC | sim | 89 a 120 | SER ou ALA | 120 |
| sgRNA-2 | 1003 | GGAA ou GACC | sim | 335 a 339 | GLY ou ASP | N/A |
| sgRNA-4 | 807 | AAG | não | 269 e 270 | GLN e SER | 340 |

*a posição da base nitrogenada foi identificada considerando a sequência utilizada na transcrição.

[1]MWQLWASLCCLLVLANA[18]RSRPSFHPLSDELVNYVNKRNTTWQAGHNFYNVDMSYLKRLCGTFLGGPK

PPQRVMFTEDLK[80]LPASFDARE↓QWPQCPTIKEIRDQGSCGSCWAFGAVEAISDRICIHTNAHVSVEVSAE

DLLTCCGSMCGDGCNGGYPAEAWNFWTRKGLVSGGLYESHVGCRPYSIPPCEHHVNGSRPPCTGEGDTP

KCSKICEPGYSPTYKQDKHYGYNSYSVSNSEKDIMAEIYKNGPVEGAFSVYSDFLLYKSGVYQ↓HVTGEM

MGGHAIRILGWGVENGTPYWLVANSWNTDWGDNGFFKILRGQDHCGIESEVVAGIPRTD[334]Q↓YWEKI[339]

Figura 2.10 – Sequência da proteína CTSB humana (código Uniprot: P07858). Em vermelho está identificada a sequência peptídeo sinal; em azul está identificado a sequência propeptídeo; em preto está a sequência da proteína madura; em verde está identificada a sequência propeptídeo C-terminal. As setas representam a posição o início das alterações na sequência de aminoácidos ocasionadas pela edição do sgRNA-1 (seta laranja), sgRNA-2 (seta amarela) e sgRNA-4 (seta roxa).

### 2.4.3. Avaliação da influência da proteína CTSB na resposta ao tratamento com ASNase

Utilizando os clones descritos acima, realizamos o ensaio de citotoxicidade na presença das três diferentes ASNases (EcA_WT, ErA_WT e ErA_DM). Os plasmídeos construídos no Brasil foram transformados em *E. coli BL21(DE3)* e a posterior indução foi realizada com IPTG. Após a expressão, as células foram submetidas a choque osmótico para obtenção da fração periplasmática, onde a enzima está localizada. As frações periplasmáticas foram purificadas em duas etapas cromatográficas, cromatografia de troca iônica e de exclusão por tamanho, e a seleção das frações puras foi feita por SDS-PAGE (figura 2.11).

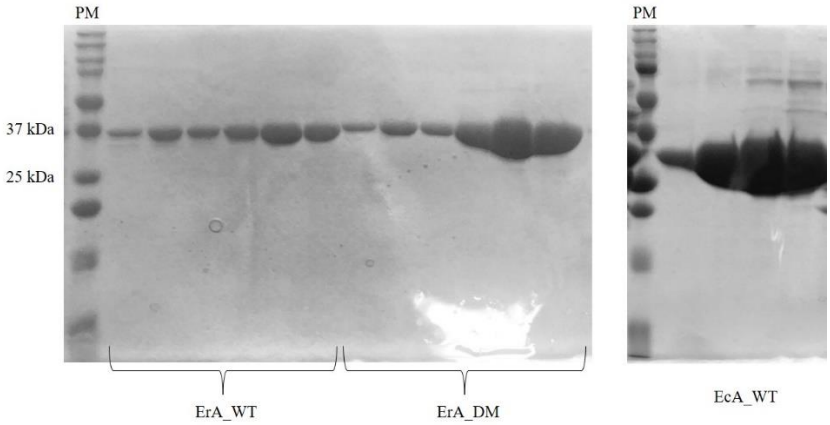



Figura 2.11 - Confirmação da purificação das enzimas ErA_WT, ErA_DM e EcA_WT por eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%. As três proteínas possuem aproximadamente 35 kDa. PM indica o padrão de massa molecular ™*Dual Color Standards* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

As amostras com elevado grau pureza foram concentradas e quantificadas a 280 nm pela Lei Lambert-Beer. A atividade específica para L-asparagina de cada proteoforma foi determinada com reagente de Nessler, método colorimétrico para quantificação de amônia por meio da curva de calibração com sulfato de amônio (figura 2.12).

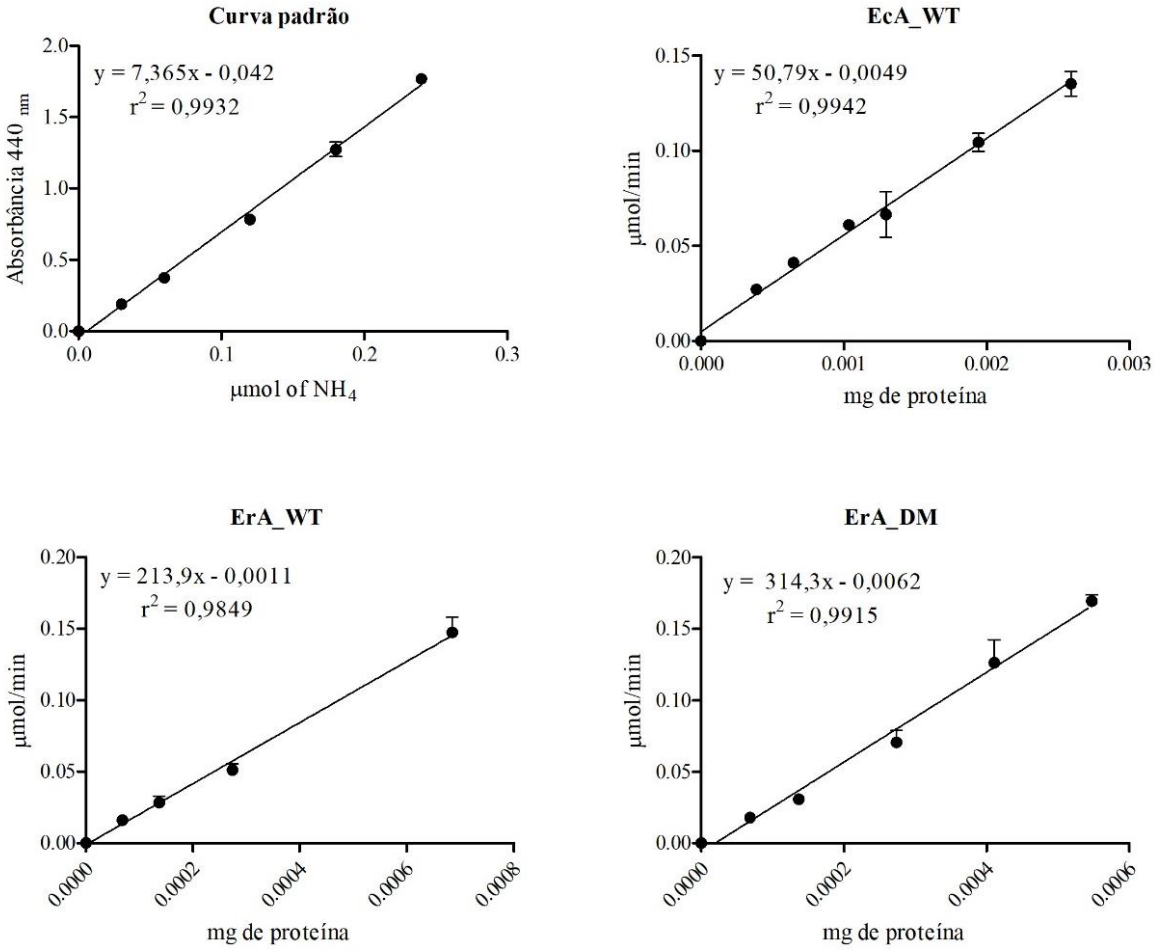



Figura 2.12 - Atividade específica para as enzimas ErA_WT, ErA_DM e EcA_WT determinada com reagente de Nessler. Curva padrão determinada com concentração conhecida de sulfato de amônio, e atividade específica das enzimas ErA_WT, ErA_DM e EcA_WT onde o gráfico representa a velocidade da reação em µmol/min em função da quantidade de proteína em miligramas; o coeficiente angular da equação da reta representa a atividade específica para cada enzima dada em U/mg, onde 1 unidade (U) é igual a 1 µmol de amônio produzido por minuto. Os pontos representam média ± erro padrão (n = 3).

As células REHcas9 + sgRNA-1 e 4, e os controles não infectados REHcas9, REHcas9 + sgRNA-Rosa26 ou sgRNA-2 foram tratados com diferentes concentrações da enzima EcA_WT, ErA_WT ou ErA_DM. Após 72 horas de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pela adição do reagente *AlamarBlue* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) (figura 2.13). Este reagente contém o corante azul resazurina que permite a quantificação das células vivas, através da reação de oxirredução metabolizada durante a respiração celular. A

resazurina é reduzida a resorufina, composto rosa fluorescente, e a intensidade da fluorescência é proporcional ao número de células vivas (BACK et al., 1999).

O ensaio de citotoxicidade apresentou uma diferença significativa no valor de $IC_{50}$ entre as células REHcas9+sgRNA-1 e o controle REHcas9 quando tratadas com EcA_WT, mas essa diferença não foi observada em relação aos controles REHcas9+sgRNA-Rosa26 ou REHcas9+sgRNA-2. Para a enzima ErA_WT não foi possível determinar os valores de $IC_{50}$, pois nas condições testadas mesmo a menor dose de enzima (0,05 U/mL) matou aproximadamente 70% das células. Quando as células foram tratadas com a ASNase ErA_DM não foram observadas diferenças entres células controle e CTSB *knockout* (tabela 2.4).

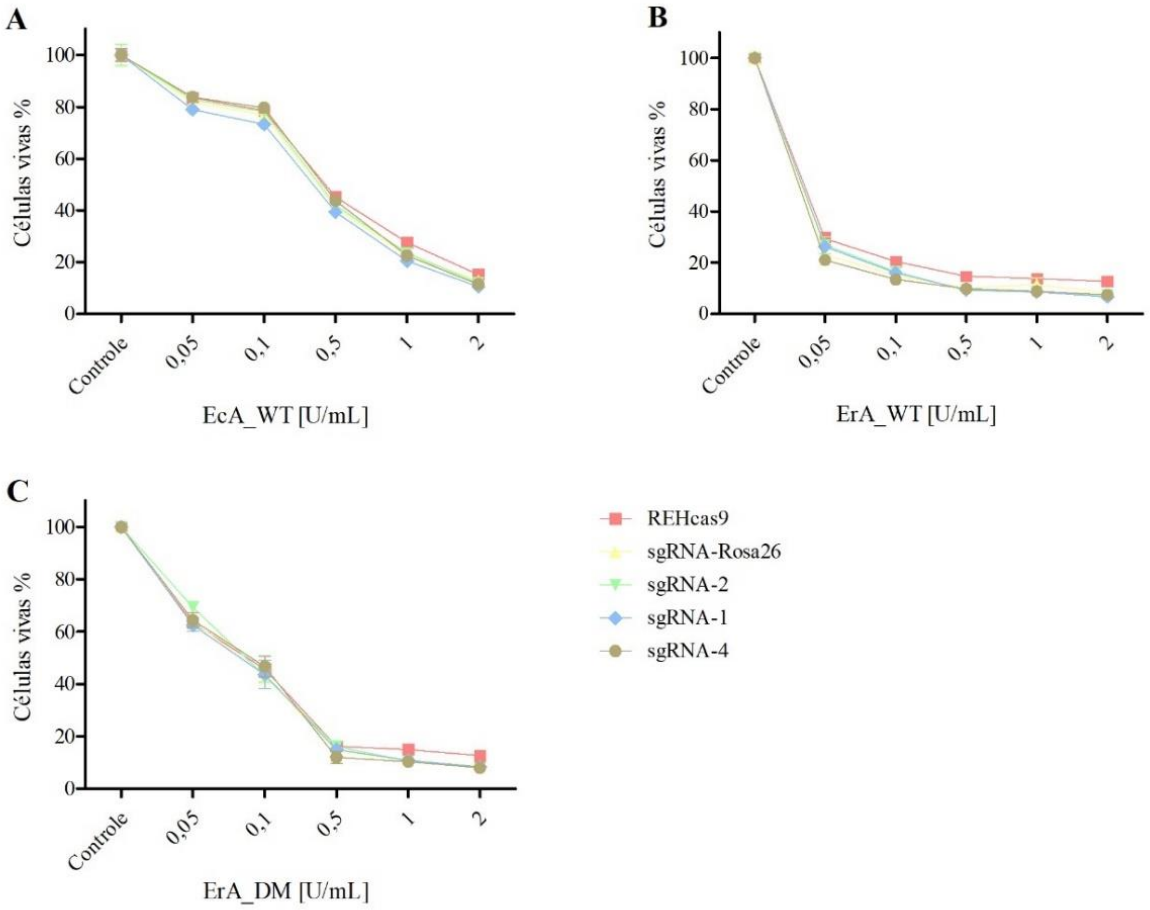



Figura 2.13 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* por fluorescência com *AlamarBlue*. As células foram tratadas com diferentes concentrações das enzimas EcA_WT (A1 e 2), ErA_WT (B1 e 2) e ErA_DM (C1 e 2) usando células REHcas9 (não infectadas), sgRNA-Rosa26, sgRNA-1, sgRNA-2 e sgRNA-4. Os controles do ensaio são as células sem o tratamento e com a adição do tampão no qual as enzimas foram diluídas. O ensaio foi realizado em triplicata analítica, e o número representa a primeira (1) e a segunda (2) réplica biológica. Os dados representam a média ± erro padrão (n = 3).

Tabela 2.4 – Valores de $IC_{50}$ (U/mL) obtidos pelo ensaio de citotoxicidade

| Célula | EcA_WT | ErA_WT | ErA_DM |
|---|---|---|---|
| REHcas9 | 0,37 | n/d | 0,088 |
| sgRNA-Rosa26 | 0,31 | n/d | 0,083 |
| sgRNA-2 | 0,32 | n/d | 0,094 |
| sgRNA-1 | 0,27* | n/d | 0,082 |
| sgRNA-4 | 0,34 | n/d | 0,088 |

n/d – valores não determinados.
*Analise estatística *Two Way ANOVA* seguido de Bonferroni *post hoc* teste ($P < 0,05$) quando comparado com as células REHcas9 dentro do mesmo tratamento.

Para confirmar o resultado obtido, realizamos o ensaio de viabilidade utilizando outra metodologia. As células REHcas9 e REHcas9+sgRNA-1 foram tratadas com as diferentes ASNases por 48 e 72 horas. Como para enzima ErA_WT não foi possível calcular o $IC_{50}$ no primeiro ensaio (figura 2.13B), neste novo ensaio acrescentamos concentrações mais baixas, iniciando em 0,0001 U/mL. Após o tratamento, a viabilidade celular foi avaliada por MTT, método colorimétrico que permite a quantificação de células vivas com o metabolismo ativo por produzem oxirredutases NAD(P)H dependentes que reduzem o tetrazólio MTT ao composto Formazan de cor roxa, dessa maneira é possível quantificar as células metabolicamente viáveis (MOSMANN, 1983).

Para as células tratadas com a ASNase EcA_WT por 48 horas não foi possível determinar os valores de $IC_{50}$. No entanto, nas demais condições não foram encontradas diferenças significativas nos valores de $IC_{50}$ (tabela 2.5). Além disso, em todas as condições testadas o perfil de viabilidade celular é o mesmo entre as células REHcas9 e REHcas9+sgRNA (figura 2.14). Portanto, mesmo com as mudanças na concentração de enzimas e tempo de tratamento não foi possível identificar diferenças significativas na viabilidade das células *knockout* para a proteína CTSB em relação ao controle.

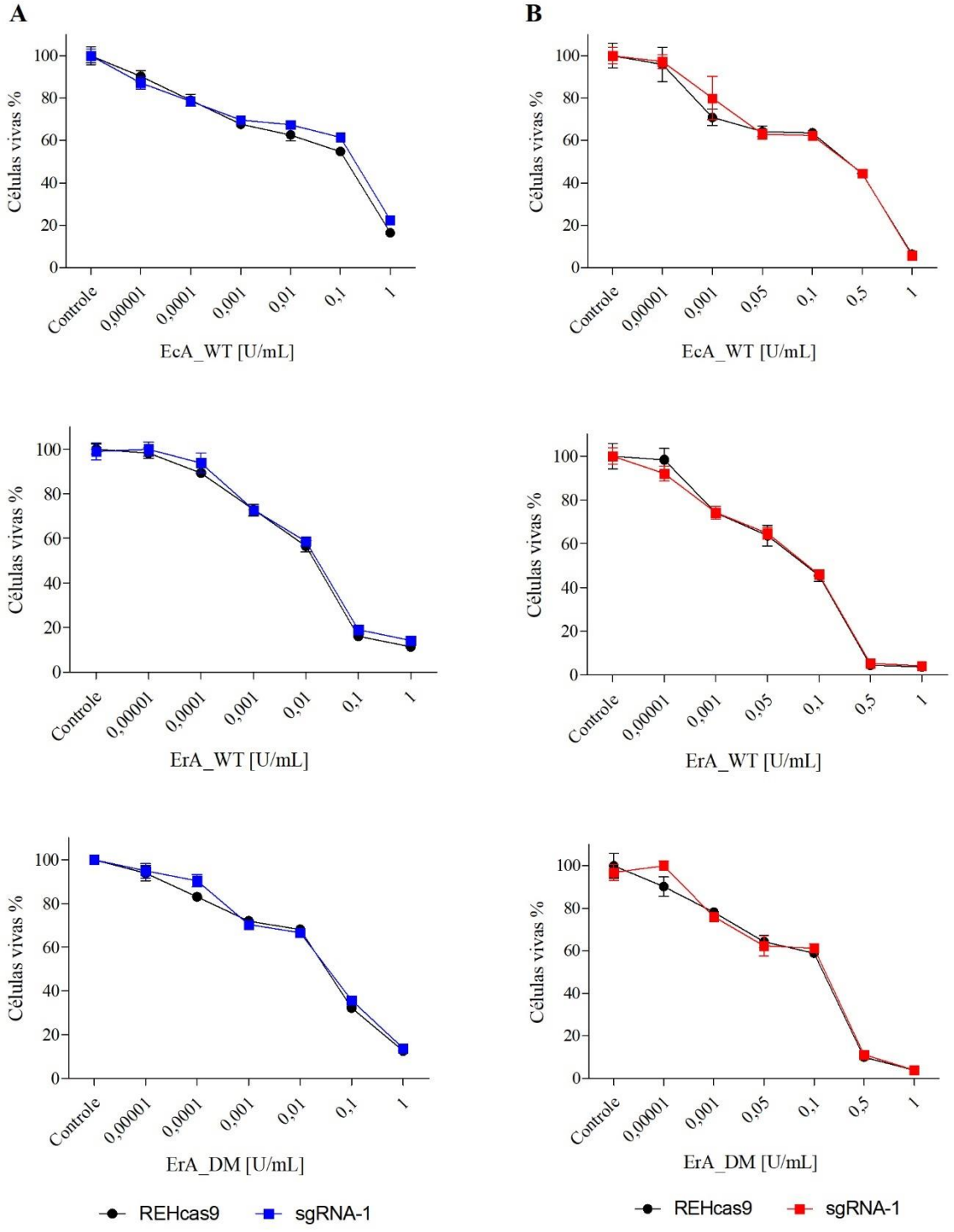



Figura 2.14 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* por colorimetria com MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações das enzimas EcA_WT, ErA_WT e ErA_DM por 48h (A) ou 72h (B) usando células REHcas9 (não infectadas) e sgRNA-1. Os controles do ensaio são as células sem o tratamento e com a adição do tampão no qual as enzimas foram diluídas. O ensaio foi realizado em triplicata analítica e os dados representam a média ± erro padrão.

Tabela 2.5 – Valores de $IC_{50}$ (U/mL) obtidos pelo ensaio de citotoxicidade com MTT

| | 48 horas | | | 72 horas | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **EcA_WT** | **ErA_WT** | **ErA_DM** | **EcA_WT** | **ErA_WT** | **ErA_DM** |
| REHcas9 | n/d | 0,0096 | 0,020 | 0,11 | 0,080 | 0,10 |
| sgRNA-1* | n/d | 0,012 | 0,022 | 0,14 | 0,082 | 0,10 |

n/d – valores não determinados.
*Analise estatística *Two Way ANOVA* seguido de Bonferroni *post hoc* teste ($P > 0,05$) quando comparado com as células REHcas9 dentro do mesmo tratamento.

## 2.5.DISCUSSÃO

Os níveis de expressão de CTSB foram avaliadas em células BCP-LLA obtidas de pacientes com LLA. As células foram classificadas em subtipos de acordo com as mutações encontradas; um pequeno grupo de pacientes foi identificado com a translocação *ETV6/RUNX1* (fenótipo característico das células REH). A análise da expressão gênica sugere uma alta expressão de CTSB; entretanto, o pequeno número de pacientes com essa translocação foi uma limitação da pesquisa (WRONA et al., 2019). O nível de expressão de CTSB em células REH ainda não está claro, mas o trabalho de Wrona (2019) sugere uma alta expressão dessa proteína em células de cultura primária. Além disso, há evidências de produção de CTSB por células REH em estudos anteriores (PATEL et al., 2009).

No entanto, uma das limitações encontradas nesse trabalho foi a identificação da proteína CTSB nas células REH aqui utilizadas. Para análise por *western blotting* foi necessária uma grande quantidade de proteína, diferente do observado para as células HEPG2. Além disso, a diferença na expressão da CTSB entre essas duas células também foi observada pela avaliação da atividade enzimática. As células REH apresentam uma atividade CTSB aproximadamente dez vezes menor do que as células HEPG2. Esses dados indicam que *in vitro* as células REH não superexpressam a proteína CTSB.

Sabemos que a expressão/regulação do gene *CTSB* passa por diversas vias complexas, desde a transcrição, modificação pós-transcricional, tradução, glicosilação, maturação e modulação, que podem ser reguladas por ativação de zimogênio, pH ou até mesmo por inibidores endógenos. A enzima pode ser encontrada nos lisossomos, citoplasma, membrana plasmática, na superfície pericelular e até mesmo secretada no meio extracelular (POGORZELSKA; ŻOŁNOWSKA; BARTOSZEWSKI, 2018).

Alterações na expressão ou atividade da CTSB têm sido associadas à progressão e metástase em vários tipos de câncer. Nas células neoplásicas, um dos mecanismos de regulação é sua ativação por sinais extracelulares, embora esse processo de regulação ainda não esteja completamente elucidado (AGGARWAL; SLOANE, 2014; GONDI; RAO, 2013; POGORZELSKA; ŻOŁNOWSKA; BARTOSZEWSKI, 2018). Diante da complexidade da sua regulação, a expressão da CTSB pode ocorrer de formas diferentes *in vivo* e *in vitro*.

Embora a expressão da CTSB tenha sido baixa nas condições utilizadas, o sistema CRISPR/cas9 foi eficiente para edição do gene *CTSB* nas células REH. Obtivemos uma alta taxa de infecção e confirmamos a edição do gene por meio de qPCR, seguido de *western blotting* e atividade enzimática. A eficiência da edição também foi observada nas células HEPG2, que expressam níveis maiores de CTSB.

Nos três sgRNAs selecionados (REHcas9 + sgRNA-1, sgRNA-2 e sgRNA-4) observamos a presença de inserções de nucleotídeos no DNA. Essas inserções ocorrem pelo mecanismo de reparo do DNA de junção não homóloga; trata-se de um processo propenso a erros de ligação direta das extremidades editadas que provocam inserções ou deleções no material genético (PELLAGATTI et al., 2015).

Assim como nas mutações pontuais, inserções ou deleções na sequência de DNA podem alterar o quadro leitura do gene, chamadas de mutações *frameshift*. Esse tipo de mutação pode alterar a estabilidade do mRNA ou a forma como a sequência é lida no ribossomo a partir do ponto da mutação, causando a terminação prematura da tradução pela presença de um novo códon de parada, ou mesmo traduzindo a proteína com a sequência de aminoácidos alterada, levando à síntese de uma proteína sem função (PELLEY, 2012).

Nos DNAs sequenciados observamos a presença de mutação *frameshift* das células editadas pelos oligos sgRNA-1 e 2 e a inserção de dois aminoácidos nas células editadas pelo oligo sgRNA-4. Nas células REHcas9 + sgRNA-1 a tradução de um códon de parada justifica a ausência da proteína no *western blotting* e a redução significativa da atividade CTSB dessas células. Nas células REHcas9 + sgRNA-4 o mesmo efeito foi observado com a inserção dos aminoácidos GLN e SER na proteína.

Nas células REHcas9 + sgRNA-2 a alteração no quadro de leitura resultou na alteração de cinco aminoácidos na porção C-terminal da proteína, não sendo tão deletéria quanto os sgRNA-1 e 4, pois a presença da proteína é mais evidente no *western blotting* e sua atividade enzimática foi próxima aos valores dos controles.

A proteína CTSB consiste em 339 aminoácidos e o oligonucleotídeo sgRNA-2 foi projetado para edição próximo à porção final da região C-terminal da CSTB, cuja sequência

compreende os aminoácidos 329 a 335. As mutações que ocorrem próximas à região C-terminal da proteína, geralmente são menos deletérias (PELLEY, 2012). Além disso, os últimos seis aminoácidos (334 a 339) são a sequência propeptídica, clivada durante o processo de maturação da proteína (TEDELIND et al., 2011). A presença da proteína observada para as células REHcas9 + gRNA-2 pode ser devido a localização de edição genética.

No entanto, analisando a viabilidade celular das REHcas9 + sgRNA-1 e REHcas9 + sgRNA-4 após o tratamento com as diferentes ASNases, concluímos que tanto os valores de $IC_{50}$ quanto o perfil de toxicidade não apresentaram diferenças quando comparados com os controles (REHcas9, REHcas9 + sgRNA-Rosa26 e REHcas9 + sgRNA-2). Apesar da proteína CTSB ser expressa constitutivamente pelas células REH (PATEL et al., 2009), a cultura in *vitro* das células e o baixo nível de expressão observado podem ter influenciado nos resultados obtidos.

## 2.6.CONCLUSÃO

As células REHcas9 foram infectadas com sucesso para a edição do gene *CTSB*. Realizamos a confirmação da edição do gene por qPCR e sequenciamento. O *knockout* da proteína CTSB foi confirmado por *western blotting* e ensaio da atividade enzimática. Identificamos uma baixa expressão de CTSB pela célula REH e para descartar a possibilidade de resultados falso-positivos da edição do gene, realizamos o mesmo processo visando o gene *CTSB* na célula HEPG2 que expressa altos níveis dessa proteína. Dessa forma, validamos a eficiência do sistema CRISPR/cas9 os sgRNAs projetados. Realizamos o ensaio de citotoxicidade utilizando as três proteoformas ASNases, porém não identificamos uma diferença significativa na viabilidade celular ou $IC_{50}$ em células REH *knockout* para CTSB. Devido ao baixo nível de expressão da proteína CTSB nas células REH, os resultados obtidos não foram conclusivos.

## 2.7.PERSPECTIVAS

- Para confirmar os resultados obtidos o melhor modelo para análise da influência da proteína CTSB nas células de LLA durante o tratamento, seria a utilização de modelos xenográficos para o estudo *in vivo*.

- Além do modelo xenográfico, outra alternativa é a indução da super expressão da proteína CTSB por CRISPR nas células REH para comparar a influência da CTSB com as células *knockout* já produzidas.
- O sequenciamento do mRNA das células REHcas9, REHcas9 + sgRNA-1 e REHcas9 superexpressando CTSB após o tratamento com as diferentes ASNases (EcA_WT, ErA_WT e ErA_DM) pode trazer novas elucidações sobre genes/proteínas envolvidas no processo resistência ao tratamento.

# REFERÊNCIAS

AGGARWAL, Neha; SLOANE, Bonnie F. Cathepsin B: Multiple roles in cancer. **Proteomics - Clinical Applications**, *[S. l.]*, v. 8, n. 5–6, p. 427–437, 2014. DOI: 10.1002/prca.201300105.

AKBARI, Mona; EBRAHIMABADI, Sima; GOLALIPOUR, Masoud; SHAHBAZI, Majid; FARAZMANDFAR, Touraj. The correction of ETV6/RUNX1 translocation in acute lymphocytic leukemia cells: a new gene targeting system by homologous recombination mechanism. **Journal of Applied Genetics**, *[S. l.]*, v. 61, n. 1, p. 67–73, 2020. DOI: 10.1007/s13353-019-00524-9. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s13353-019-00524-9.

ANJA, Pišlar; ANAHID, Jewett; JANKO, Kos. Cysteine cathepsins: Their biological and molecular significance in cancer stem cells. **Seminars in Cancer Biology**, *[S. l.]*, v. 53, n. May, p. 168–177, 2018. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.07.010.

BACK, Stephen A.; KHAN, Ruhi; GAN, Xiadong; ROSENBERG, Paul A.; VOLPE, Joseph J. A new Alamar Blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. **Journal of Neuroscience Methods**, *[S. l.]*, v. 91, n. 1–2, p. 47–54, 1999. DOI: 10.1016/S0165-0270(99)00062-X.

BARISONE, Gustavo A.; SATAKE, Noriko; LEWIS, Carly; DUONG, Connie; CHEN, Cathy; LAM, Kit S.; NOLTA, Jan; DÍAZ, Elva. Loss of MXD3 induces apoptosis of Reh human precursor B acute lymphoblastic leukemia cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, *[S. l.]*, v. 54, n. 4, p. 329–335, 2015. DOI: 10.1016/j.bcmd.2014.12.002.

BERTUCCIO, Salvatore Nicola; SERRAVALLE, Salvatore; ASTOLFI, Annalisa; LONETTI, Annalisa; INDIO, Valentina; LESZL, Anna; PESSION, Andrea; MELCHIONDA, Fraia. Identification of a Cytogenetic and molecular subgroup of acute myeloid leukemias showing sensitivity to L-asparaginase. **Oncotarget**, *[S. l.]*, v. 8, n. 66, p. 109915–109923, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.18565.

CHEN, Shih Hsiang. Asparaginase Therapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Focus on the Mode of Drug Resistance. **Pediatrics and Neonatology**, *[S. l.]*, v. 56, n. 5, p. 287–293, 2015. DOI: 10.1016/j.pedneo.2014.10.006. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.pedneo.2014.10.006.

COSTA, Iris Munhoz; CUSTÓDIO MOURA, Débora; MEIRA LIMA, Guilherme; PESSOA, Adalberto; ORESCO DOS SANTOS, Camila; DE OLIVEIRA, Marcos A.; MONTEIRO, Gisele. Engineered asparaginase from Erwinia chrysanthemi enhances asparagine hydrolase activity and diminishes enzyme immunoreactivity - a new promise to treat acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 97, n. 1, p. 228–239, 2022. DOI: 10.1002/jctb.6933.

FERNANDEZ, Christian A. et al. Genome-wide analysis links NFATC2 with asparaginase hypersensitivity. **Blood**, *[S. l.]*, v. 126, n. 1, p. 69–75, 2015. DOI: 10.1182/blood-2015-02-628800.

GONDI, Christopher S.; RAO, Jasti S. Cathepsin B as a cancer target. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, *[S. l.]*, v. 17, n. 3, p. 281–291, 2013. DOI: 10.1517/14728222.2013.740461. Disponível em: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2013.740461.

HARMS, Etti; WEHNER, Andreas; JENNINGS, Michael P.; PUGH, Kathryn J.; BEACHAM, Ifor R.; ROHM, Klaus H. Construction of expression systems for Escherichia cofi asparaginase II and two-step purification of the recombinant enzyme from periplasmic extracts. **Protein Expression and Purification**, *[S. l.]*, v. 2, n. 2–3, p. 144–150, 1991. DOI: 10.1016/1046-5928(91)90063-O.

HERMANOVA, Ivana; ZALIOVA, Marketa; TRKA, Jan; STARKOVA, Julia. Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. **Experimental Hematology**, *[S. l.]*, v. 40, n. 8, p. 657–665, 2012. DOI: 10.1016/j.exphem.2012.04.005. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2012.04.005.

HOOK, Gregory; JACOBSEN, J. Steven; GRABSTEIN, Kenneth; KINDY, Mark; HOOK, Vivian. Cathepsin B is a new drug target for traumatic brain injury therapeutics: Evidence for E64d as a promising lead drug candidate. **Frontiers in Neurology**, *[S. l.]*, v. 6, n. SEP, p. 1–27, 2015. DOI: 10.3389/fneur.2015.00178.

KHATOON, Zainab; FIGLER, Bryan; ZHANG, Hui; CHENG, Feng. Introduction to RNA-seq and its applications to drug discovery and development. **Drug Development Research**, *[S. l.]*, v. 75, n. 5, p. 324–330, 2014. DOI: 10.1002/ddr.21215.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, *[S. l.]*, v. 227, p. 680–685, 1970.

MALARD, Florent; MOHTY, Mohamad. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, *[S. l.]*, v. 395, n. 10230, p. 1146–1162, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)33018-1. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1.

MCGLINCHEY, Ryan P.; LEE, Jennifer C. Cysteine cathepsins are essential in lysosomal degradation of α-synuclein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, *[S. l.]*, v. 112, n. 30, p. 9322–9327, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1500937112.

MELOUANE, Aicha; GHANEMI, Abdelaziz; AUBÉ, Simon; YOSHIOKA, Mayumi; ST-

AMAND, Jonny. Differential gene expression analysis in ageing muscle and drug discovery perspectives. **Ageing Research Reviews**, *[S. l.]*, v. 41, n. November 2017, p. 53–63, 2018. DOI: 10.1016/j.arr.2017.10.006. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.10.006.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, *[S. l.]*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1039/c6ra17788c.

OLSON, Oakley C.; JOYCE, Johanna A. Cysteine cathepsin proteases: Regulators of cancer progression and therapeutic response. **Nature Reviews Cancer**, *[S. l.]*, v. 15, n. 12, p. 712–729, 2015. DOI: 10.1038/nrc4027. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/nrc4027.

PATEL, Naina et al. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. **Journal of Clinical Investigation**, *[S. l.]*, v. 119, n. 7, p. 1964–1973, 2009. DOI: 10.1172/jci37977.

PELLAGATTI, Andrea; DOLATSHAD, Hamid; VALLETTA, Simona; BOULTWOOD, Jacqueline. Application of CRISPR/Cas9 genome editing to the study and treatment of disease. **Archives of Toxicology**, *[S. l.]*, v. 89, n. 7, p. 1023–1034, 2015. DOI: 10.1007/s00204-015-1504-y.

PELLEY, John W. Protein Synthesis and Degradation. **Elsevier's Integrated Review Biochemistry**, *[S. l.]*, p. 149–160, 2012. DOI: 10.1016/b978-0-323-07446-9.00017-9.

POGORZELSKA, Aneta; ŻOŁNOWSKA, Beata; BARTOSZEWSKI, Rafał. Cysteine cathepsins as a prospective target for anticancer therapies—current progress and prospects. **Biochimie**, *[S. l.]*, v. 151, p. 85–106, 2018. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.05.023.

RICHARDS, Nigel G. J.; KILBERG, Michael S. NIH Public Access. **Annu Rev Biochem**, *[S. l.]*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2006. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142520.Asparagine.

RODRIGUES, Mariane A. D. et al. Influence of lysosomal protease sensitivity in the immunogenicity of the antitumor biopharmaceutical asparaginase. **Biochemical Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 182, n. September, 2020. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114230.

SHI, Junwei; WANG, Eric; MILAZZO, Joseph P.; WANG, Zhihua; KINNEY, Justin B.; VAKOC, Christopher R. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. **Nature Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 33, n. 6, p. 661–667, 2015. DOI: 10.1038/nbt.3235.Discovery.

TANG, Chao et al. Chemotherapy-induced niche perturbs hematopoietic reconstitution in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, *[S. l.]*, v. 37, n. 1, p. 1–14, 2018. DOI: 10.1186/s13046-018-0859-3.

TEDELIND, Sofia; JORDANS, Silvia; RESEMANN, Henrike; BLUM, Galia; BOGYO, Matthew; FÜHRER, Dagmar; BRIX, Klaudia. Cathepsin B trafficking in thyroid carcinoma cells. **Thyroid Research**, *[S. l.]*, v. 4, n. SUPPL. 1, p. 1–16, 2011. DOI: 10.1186/1756-6614-4-S1-S2.

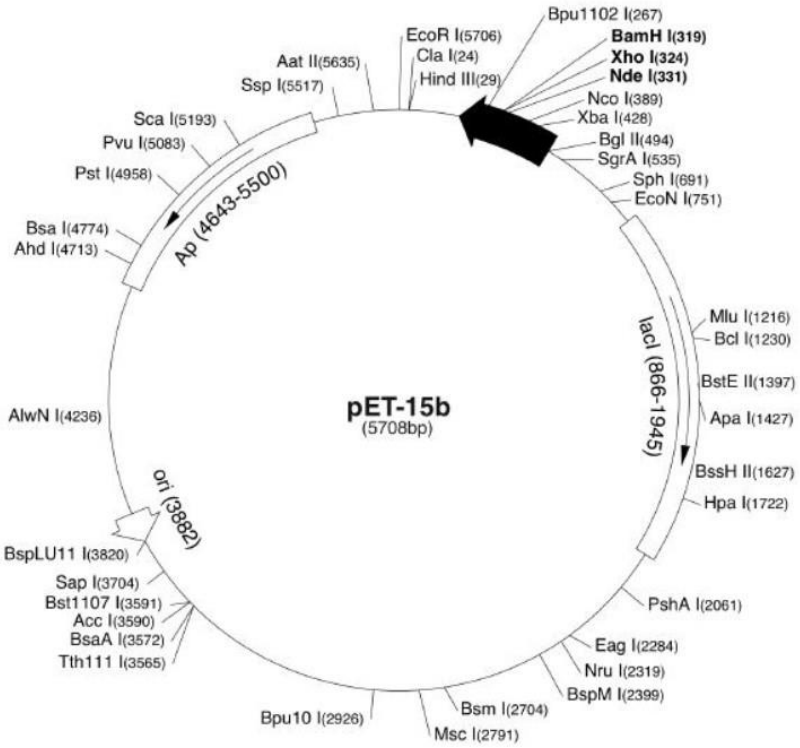
VAN DER MEER, Laurens T. et al. A germ line mutation in cathepsin B points toward a role in asparaginase pharmacokinetics. **Blood**, *[S. l.]*, v. 124, n. 19, p. 3027–3029, 2014. DOI: 10.1182/blood-2014-06-582627.

VAN DER MEER, Laurens T. et al. In vivo imaging of antileukemic drug asparaginase reveals a rapid macrophage-mediated clearance from the bone marrow. **Journal of Nuclear Medicine**, *[S. l.]*, v. 58, n. 2, p. 214–220, 2017. DOI: 10.2967/jnumed.116.177741.

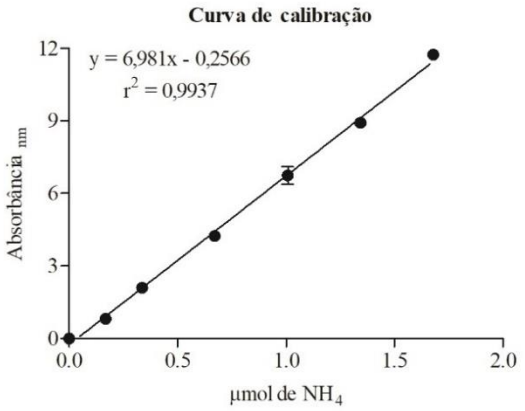
WRONA, Ewa et al. Gene expression of ASNS, LGMN and CTSB is elevated in a subgroup of childhood BCP-ALL with PAX5 deletion. **Oncology Letters**, *[S. l.]*, v. 18, n. 6, p. 6926–6932, 2019. DOI: 10.3892/ol.2019.11046.

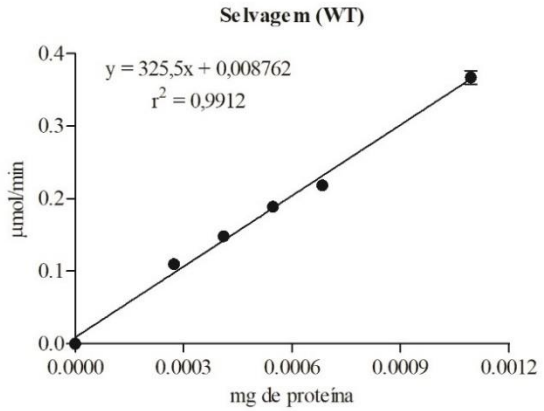
# ANEXO A – MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-15b

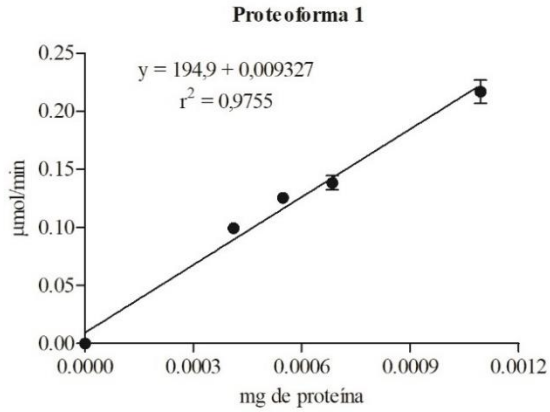
| pET-15b sequence landmarks | |
|---|---|
| T7 promoter | 463-479 |
| T7 transcription start | 452 |
| His•Tag coding sequence | 362-380 |
| Multiple cloning sites | |
| (*Nde* I - *Bam* H I) | 319-335 |
| T7 terminator | 213-259 |
| lacI coding sequence | (866-1945) |
| pBR322 origin | 3882 |
| *bla* coding sequence | 4643-5500 |

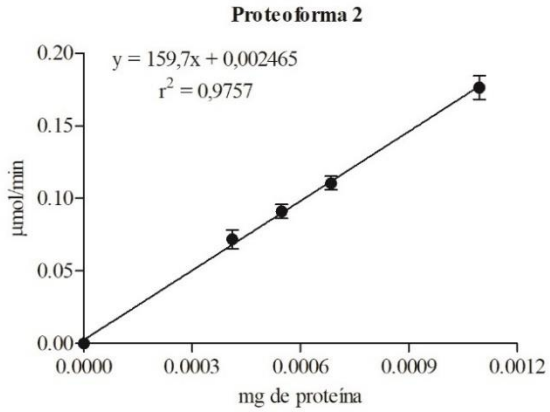


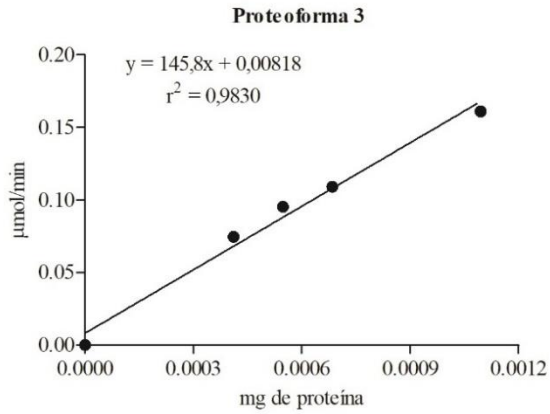
# ANEXO B – ENSAIO DE ATIVIDADE ASPARAGINÁSICA DAS PROTEOFORMAS MUTANTES

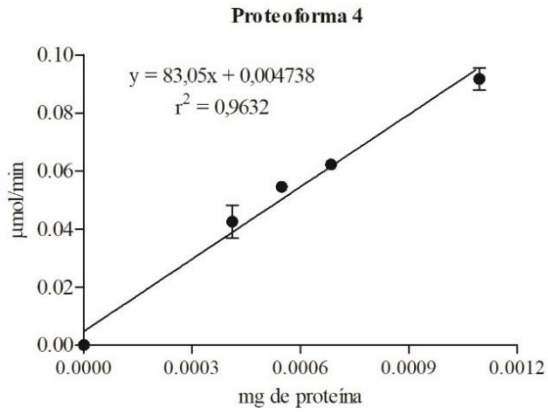


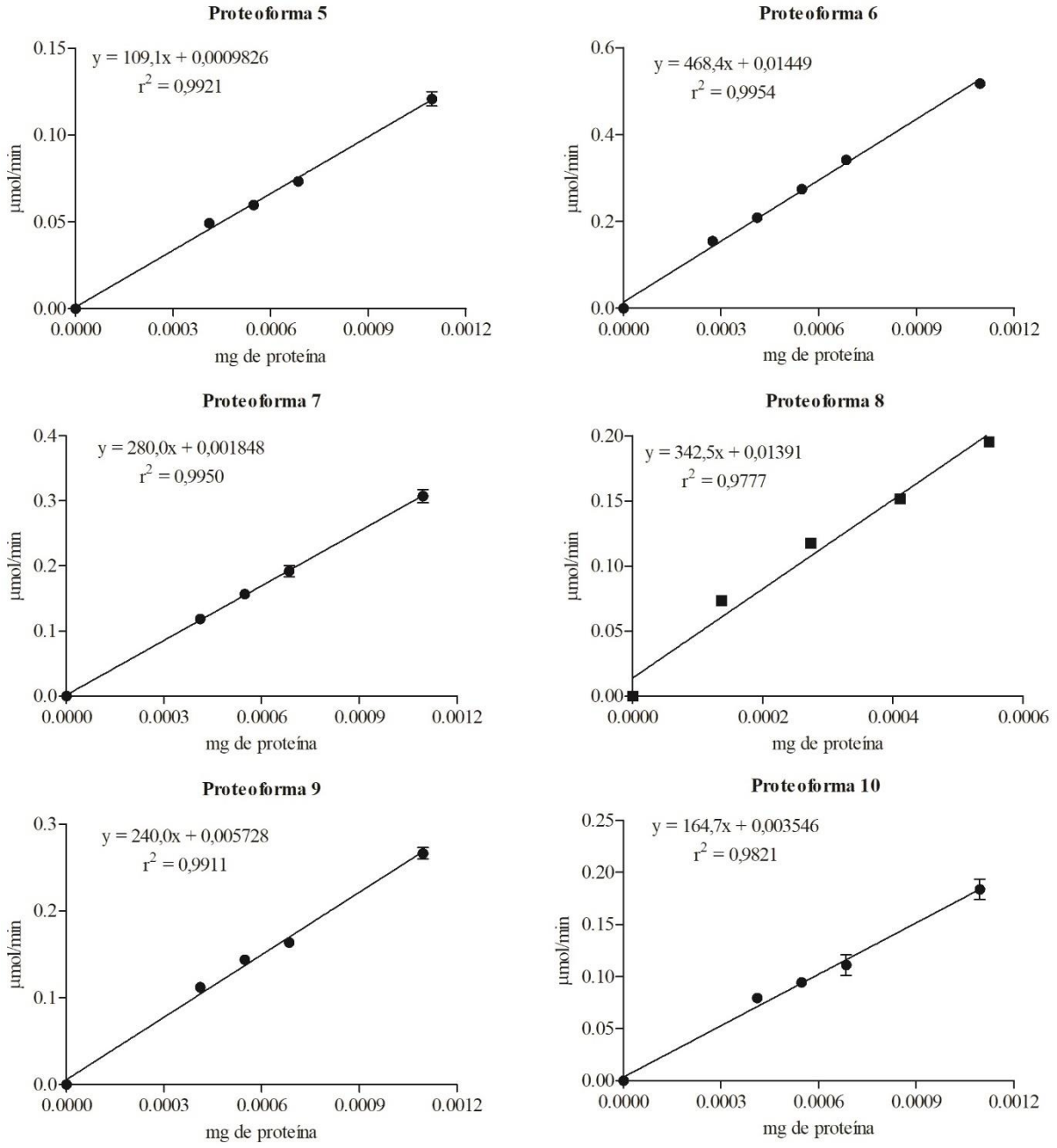



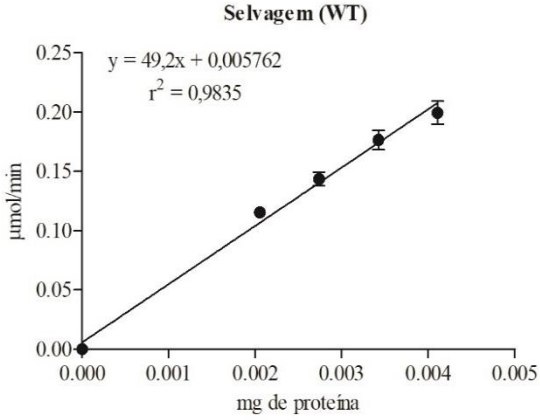



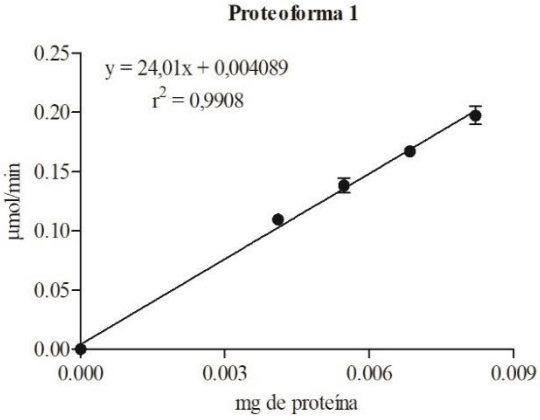
# ANEXO B – ENSAIO DE ATIVIDADE ASPARAGINÁSICA DAS PROTEOFORMAS MUTANTES (cont.)

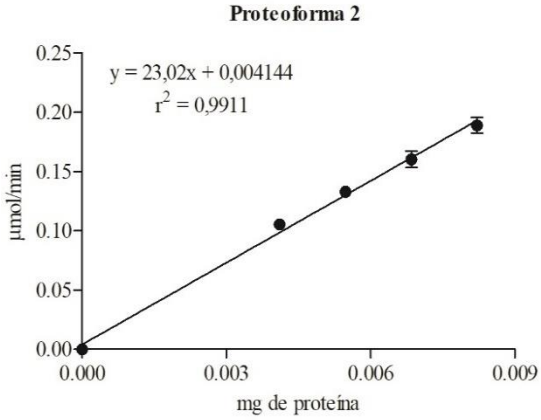


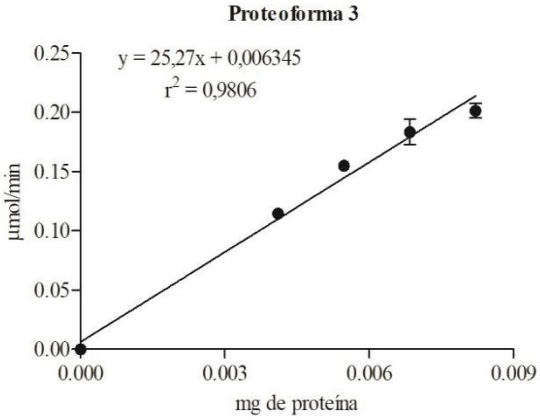

Anexo B - Atividade específica para L-asparagina das proteoformas 1 a 10 e selvagem (WT), e curva de calibração com sulfato de amônio mensuradas por reagente de Nessler. Gráfico da velocidade em µmol/min em função da quantidade em miligrama de proteína, onde o coeficiente angular da equação da reta representa a atividade específica para cada enzima dada em U/mg. Os pontos representam a média ± erro padrão (n = 3). Os gráficos foram gerados com o programa GraphPad Prism 5.0.

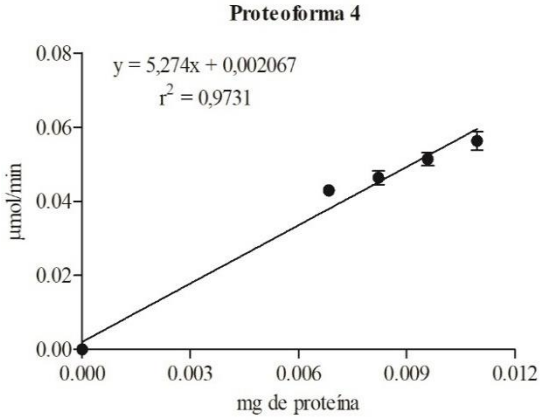
# ANEXO C - ENSAIO DE ATIVIDADE GLUTAMINÁSICA DAS PROTEOFORMAS MUTANTES

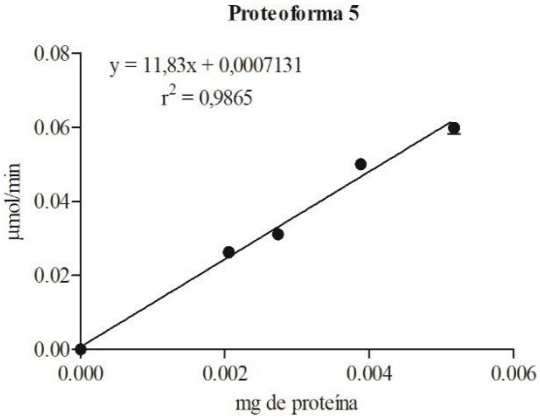


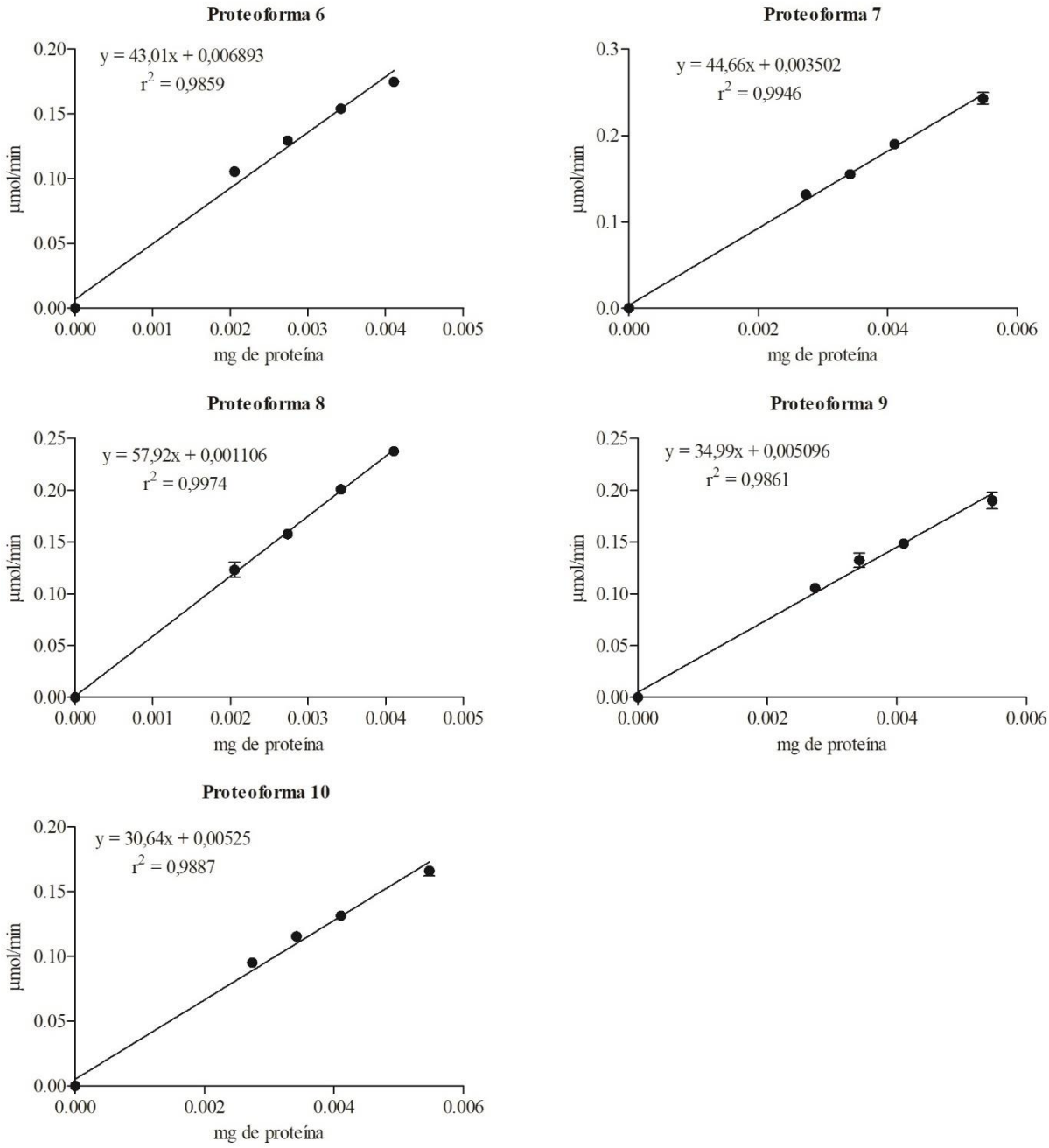



# ANEXO C - ENSAIO DE ATIVIDADE GLUTAMINÁSICA DAS PROTEOFORMAS MUTANTES (cont.)




Anexo C - Atividade específica para L-glutamina das proteoformas 1 a 10 e selvagem (WT), e curva de calibração com sulfato de amônio mensuradas por reagente de Nessler. Gráfico da velocidade em µmol/min em função da quantidade em miligrama de proteína, onde o coeficiente angular da equação da reta representa a atividade específica para cada enzima dada em U/mg. Os pontos representam a média ± erro padrão (n = 3). Os gráficos foram gerados com o programa GraphPad Prism 5.0.

# ANEXO D – ARTIGO PUBLICADO (primeira página)

Research Article

Received: 20 May 2021 Revised: 21 September 2021 Accepted article published: 25 September 2021 Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jctb.6933

## Engineered asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* enhances asparagine hydrolase activity and diminishes enzyme immunoreactivity - a new promise to treat acute lymphoblastic leukemia

**Iris Munhoz Costa,[a*] Débora Custódio Moura,[a] Guilherme Meira Lima,[a] Adalberto Pessoa,[a] Camila Oresco dos Santos,[b] Marcos A de Oliveira[c] and Gisele Monteiro[a*]**

### Abstract

**BACKGROUND: The treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) uses the biopharmaceutical L-asparaginase (ASNase) as the main medication. This drug, from bacterial origin (*Escherichia coli* or *Erwinia chrysanthemi*), depletes L-asparagine (Asn) and secondarily L-glutamine (Gln – GLNase activity) from the bloodstream, leading leukemic cells to die by deprivation of Asn. The use of ASNase is limited by the high incidence of adverse effects, which collectively can specifically impair quality of life of patients. Its high toxicity caused by the product of the hydrolysis of amino acids and the formation of anti-ASNase antibodies often required treatment interruption, thus reducing the chances of cure and increasing the rates of disease relapse.**

**RESULTS: In order to improve enzymatic activity, while reducing toxicity, we developed through directed evolution a double-mutant ASNase from *Erwinia chrysanthemi* (Erw_DM), which has specific activity for Asn 46% higher than the wild-type enzyme (Erw_WT). This makes it possible to reduce the amount of protein necessary for depletion of this amino acid and, consequently, the reduction of GLNase activity, considered toxic. *In silico* analysis showed that a lower number of epitopes was exposed, resulting in reduced recognition of the recombinant protein by antibody anti-ASNase observed *in vitro* assay. Furthermore, we observed the same cytotoxic profile for the MOLT-4 and REH ALL cell lines using 40% lower protein mass of Erw_DM to achieve the minimum enzyme activity required in the bloodstream during treatment.**

**CONCLUSION: Altogether, our findings describe a potent and less immunogenic ASNase, an improvement that may alleviate treatment adverse effects developed in anti-ALL therapy.**
**© 2021 Society of Chemical Industry (SCI).**

*Supporting information may be found in the online version of this article.*

**Keywords:** L-asparaginase; *Erwinia chrysanthemi*; protein engineering; mutation; immunogenic epitopes; lower therapeutic ASNase dose

### INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) represents a quarter of all childhood cancer cases (0–15 years) and 80% of all childhood leukemia cases.[1,2] Despite the lower incidence in adults – approximately 1% of total adult cancers – 40% of the cases of ALL are diagnosed in patients older than 20 years.[3,4] Disease-free survival in 5 years occurs in up to 90% of childhood cases. However, this prognosis is not so favorable for adult ALL; only 40% of patients have complete remission of the disease.[1,3]

The main medication used during treatment is the biopharmaceutical L-asparaginase (ASNase), obtained from the bacteria *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi* (also called *Dickeya chrysanthemi* or *Pectobacterium chrysanthemi*). The enzyme is responsible for the hydrolysis of the amino acids Asn and Gln, and its mechanism of action is to deprive leukemic cells from obtaining serum Asn; ALL cells, generally, present a deficiency in the endogenous synthesis of this amino acid.[5,6]

* *Correspondence to: I Munhoz Costa or G Monteiro, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. E-mail: iris.munhoz@usp.br (Munhoz Costa); smgisele@usp.br (Monteiro)*

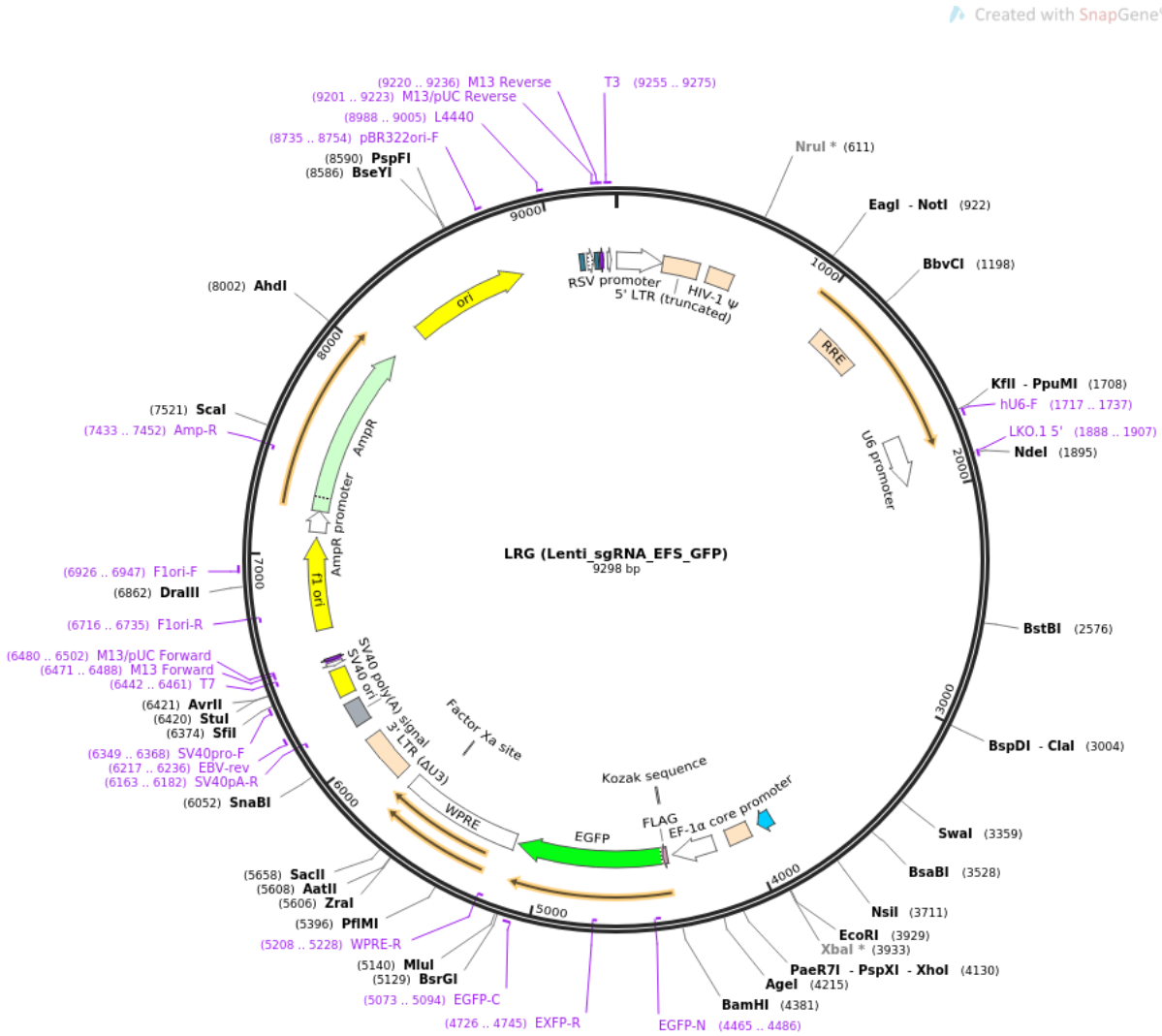
a *Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

b *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA*

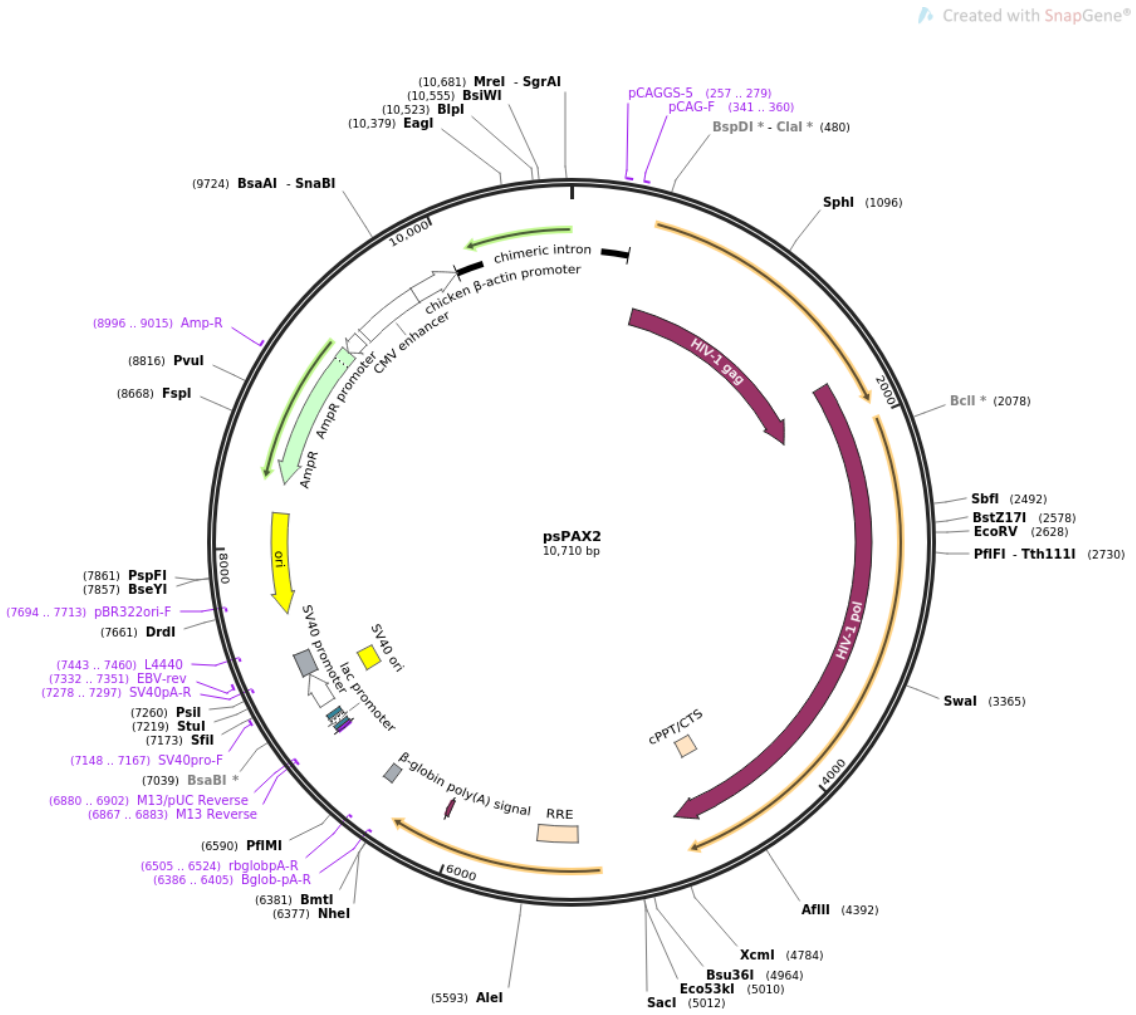
c *Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil*

 © 2021 Society of Chemical Industry (SCI).

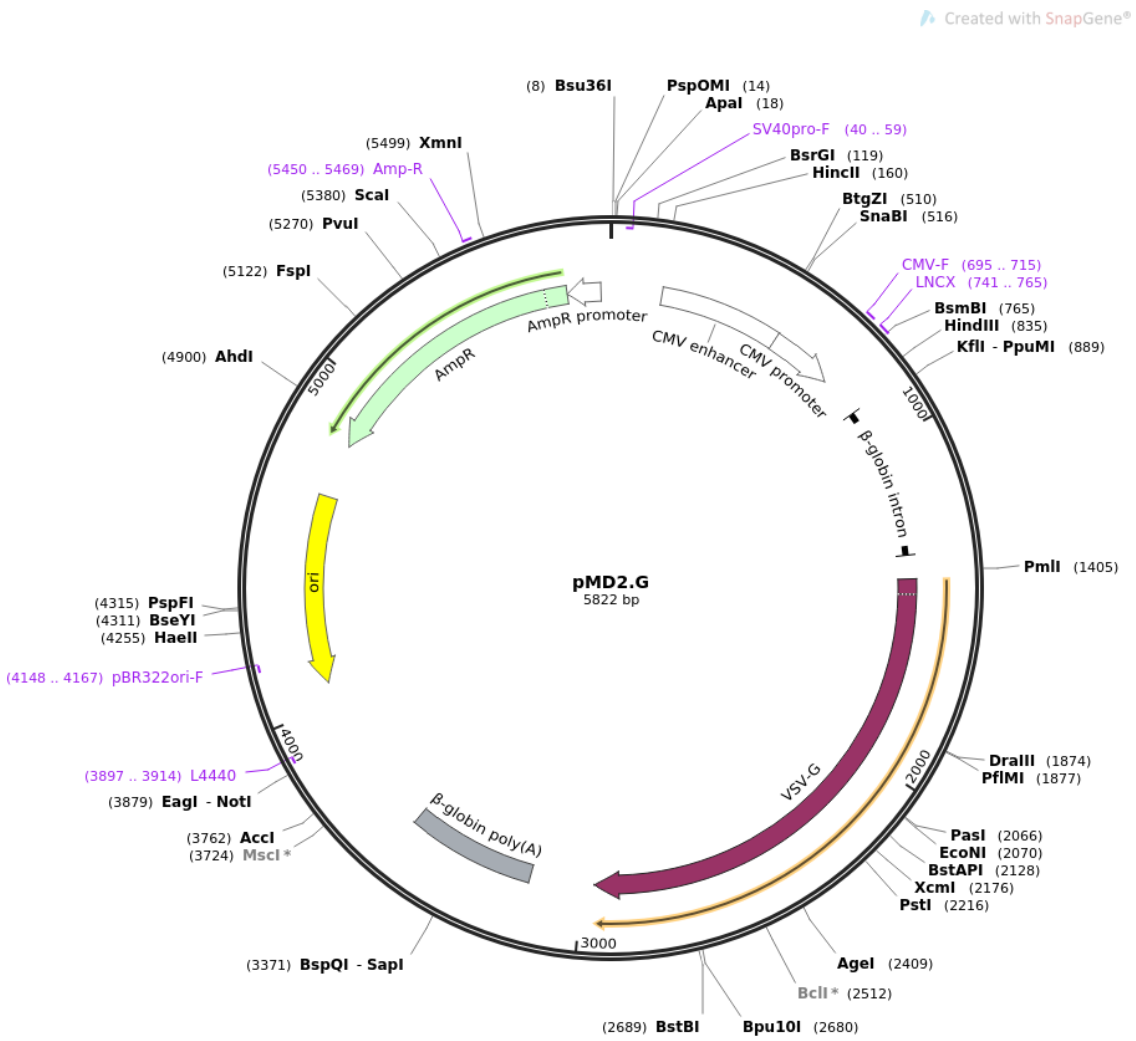
# ANEXO E – MAPA DO PLASMÍDEO LGR (Lenti_sgRNA-EFS_GFP)



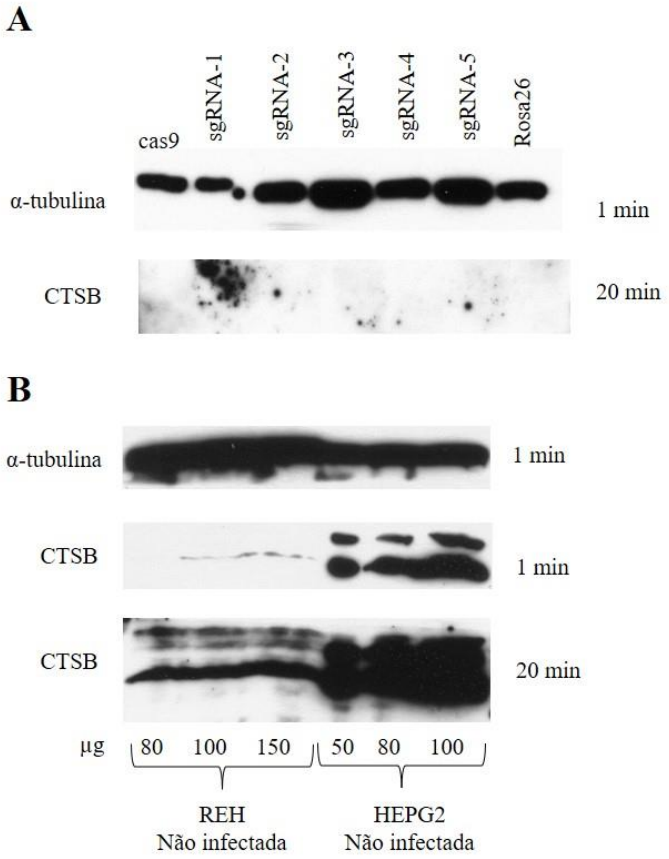
# ANEXO F – MAPA DO PLASMÍDEO psPAX2



# ANEXO G – MAPA DO PLASMÍDEO pMD2.G



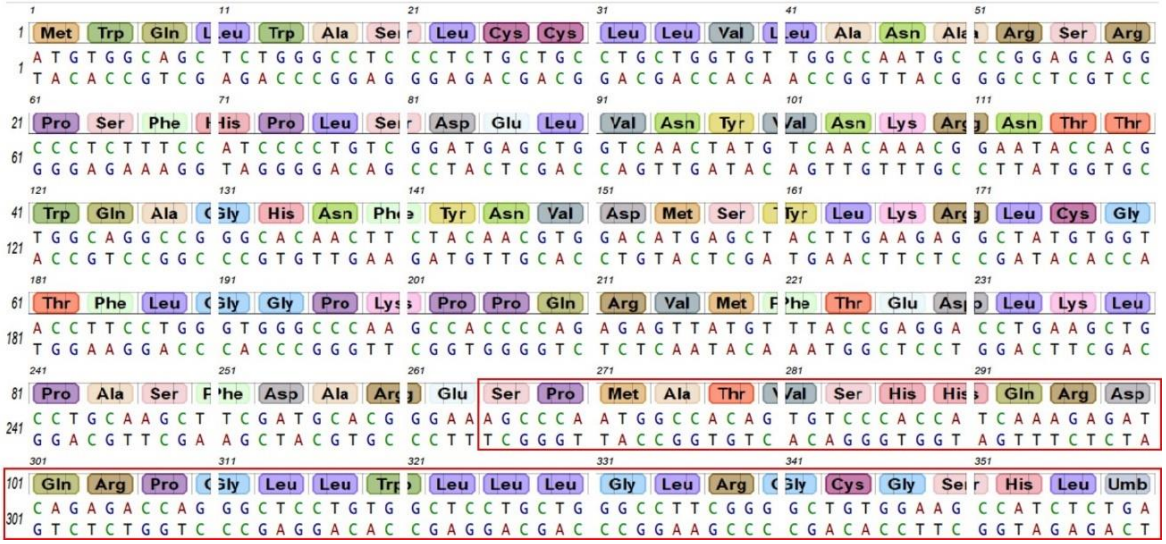
# ANEXO H – WESTERN BLOTTING PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA CTSB NAS CÉLULAS REH E HEPG2



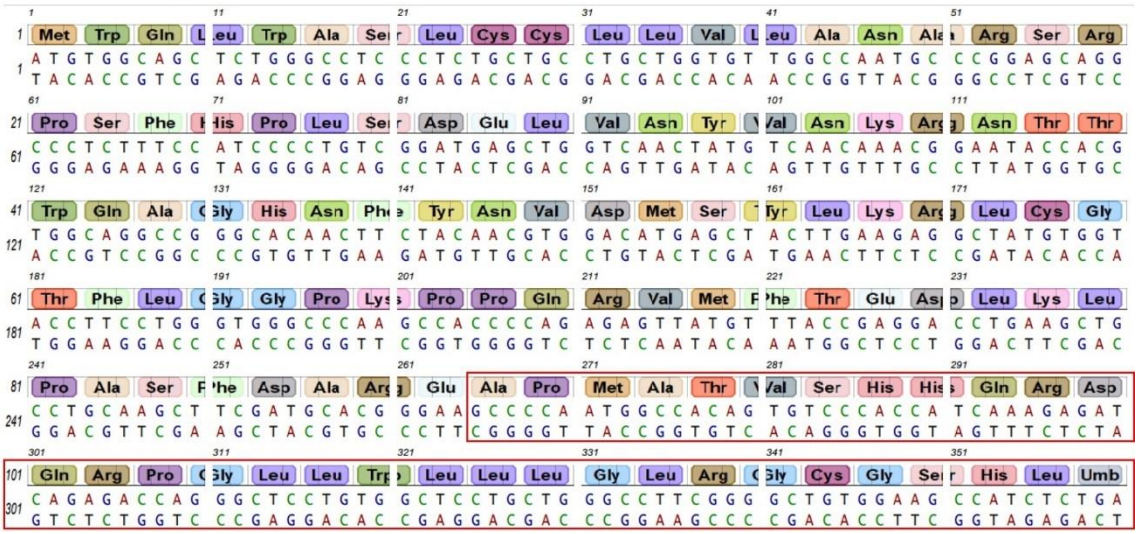

ANEXO H - *Western blotting* para detecção da proteína CTSB. A- Extrato proteico das células REHcas9, REHcas9 + sgRNAs (1 a 5 e Rosa26) contra o anticorpo anti-CTSB e anti-α-tubulina como controle. As células (4 x $10^5$) foram lisadas e 20 µL do extrato proteico foi aplicado no gel. B – Extrato proteico das células REH WT e HEPG2 WT (não infectadas com a proteína cas9 e nem com os sgRNAs) contra o anticorpo anti-CTSB e anti-α-tubulina como controle. As células foram lisadas e a quantidade proteína total foi determinada por *Bradford*, quantidade variando de 50 a 150 µg foram aplicadas no gel. A revelação da exposição foi feita com 1 ou 20 minutos, indicado na figura.

# ANEXO I – ANÁLISE DA SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS TRANSCRITOS DA PROTEÍNA CTSB APÓS A EDIÇÃO

**sgRNA-1 – Inserção das bases AGCC**

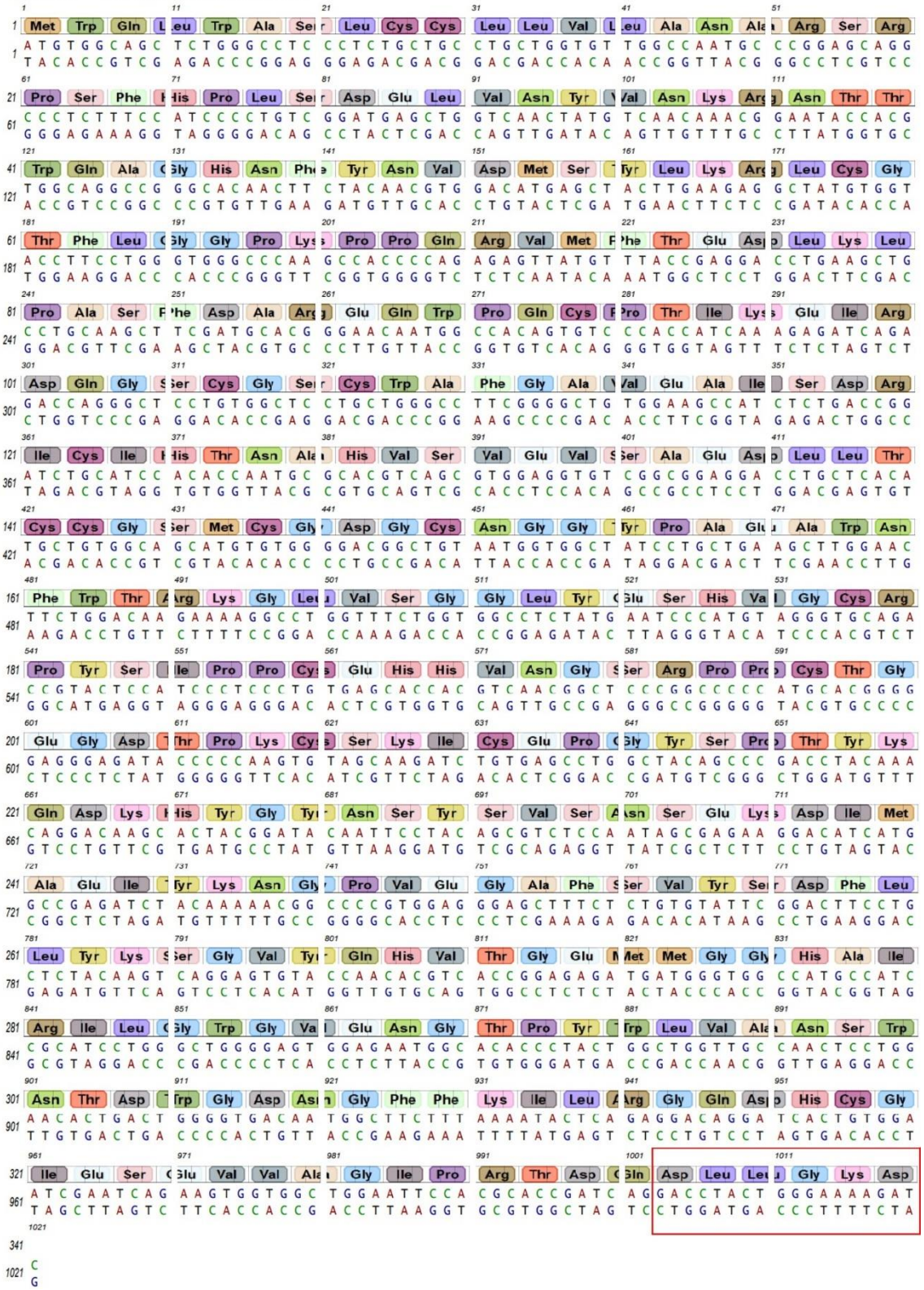


**sgRNA-1 – Inserção das bases GCCC**



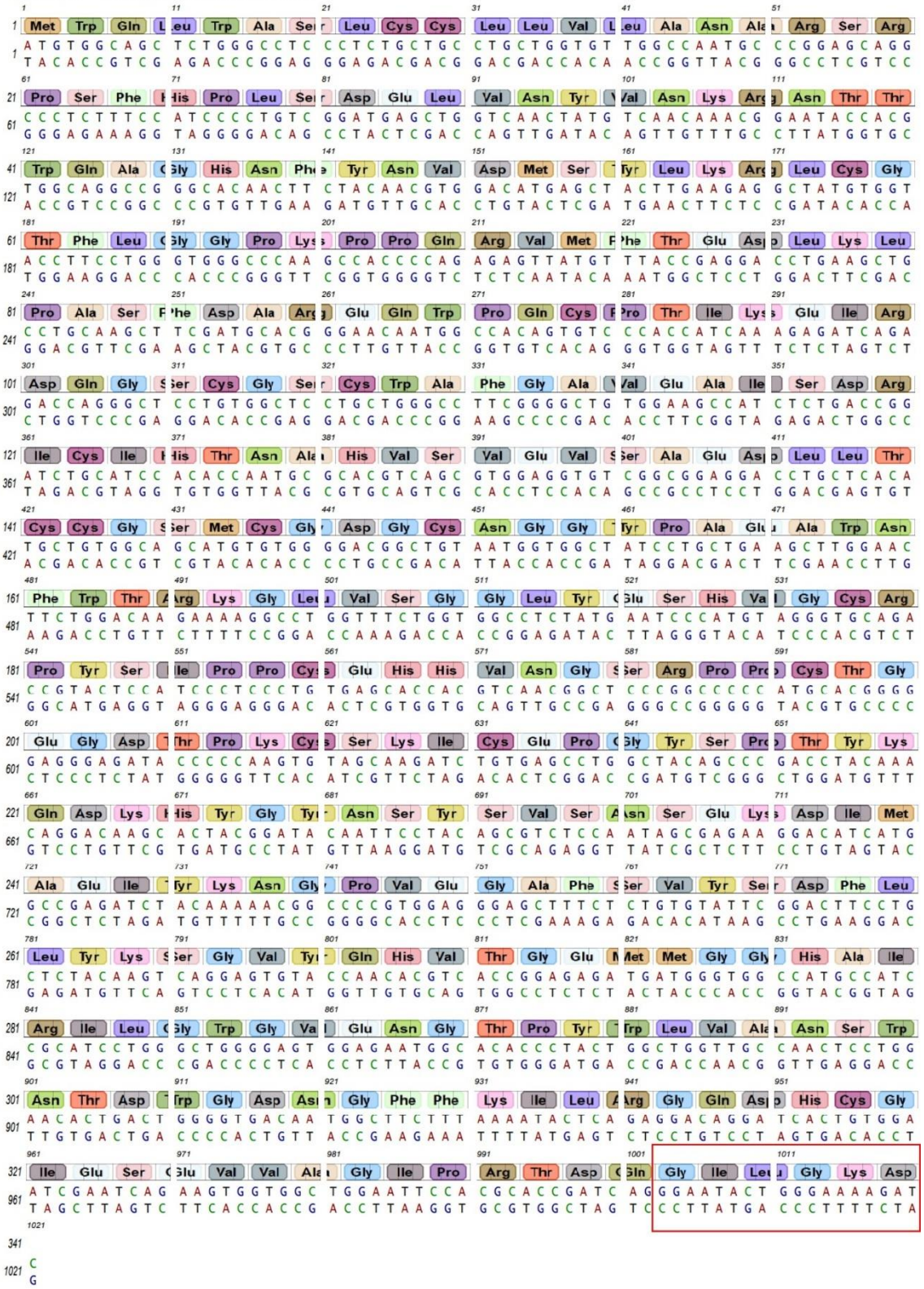
# ANEXO I – ANÁLISE DA SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS TRANSCRITOS DA PROTEÍNA CTSB APÓS A EDIÇÃO (cont.)

**sgRNA-2 – Inserção das bases GACC**



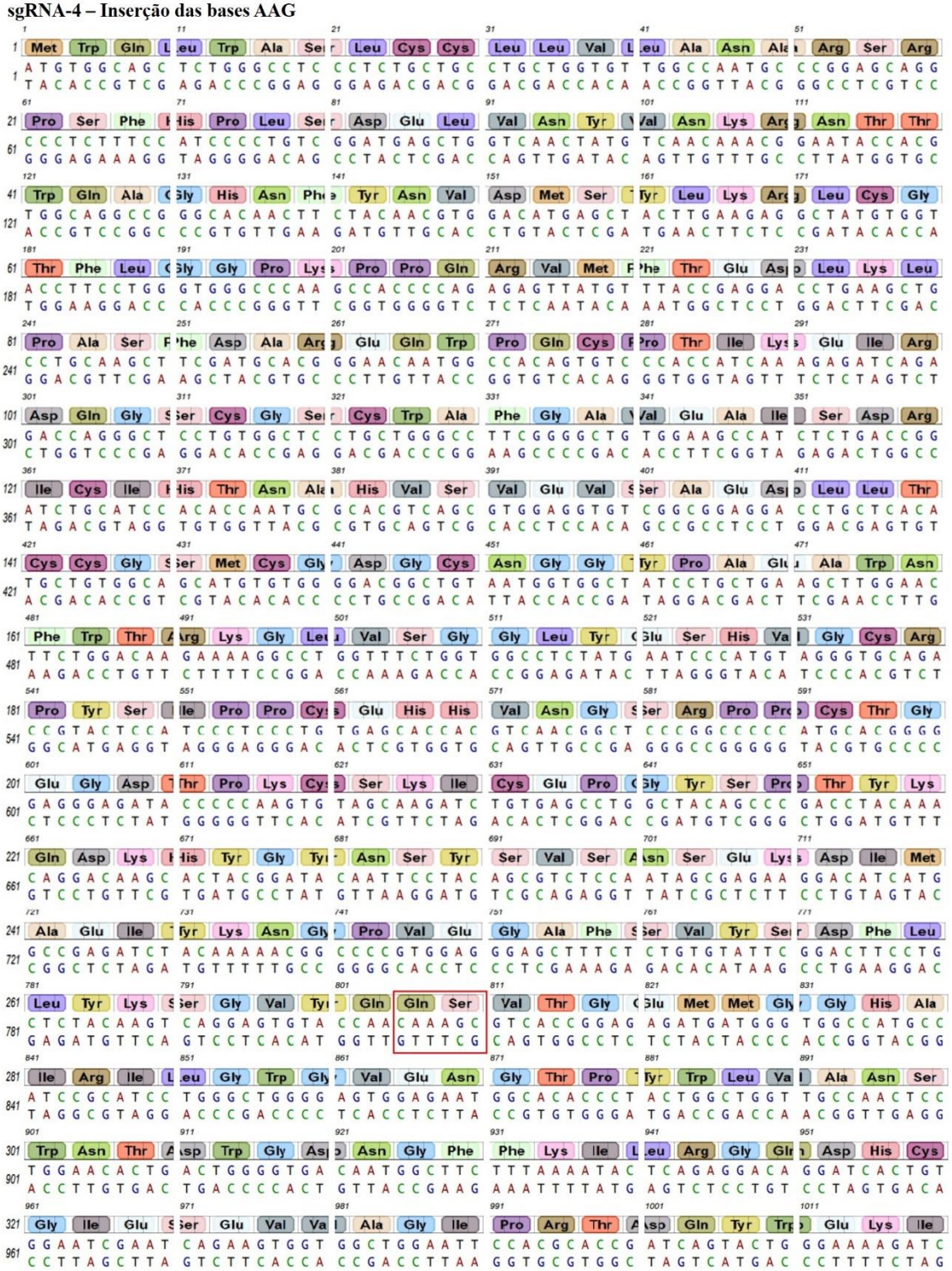
# ANEXO I – ANÁLISE DA SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS TRANSCRITOS DA PROTEÍNA CTSB APÓS A EDIÇÃO (cont.)

**sgRNA-2 – Inserção das bases GGAA**



# ANEXO I – ANÁLISE DA SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS TRANSCRITOS DA PROTEÍNA CTSB APÓS A EDIÇÃO (cont.)

**sgRNA-4 – Inserção das bases AAG**



ANEXO I - Análise da sequência de aminoácidos da proteína CTSB humana após a edição com os sgRNA-1, 2 e 4. Em destaque com o quadrado vermelho estão os resíduos modificados após a edição. Para os sgRNA- 1 e 2 foram analisadas as duas possiblidades de inserção identificadas no sequenciamento do DNA. Na sequência da proteína editada pelo sgRNA-1, Umb representa o códon de parada.

# ANEXO J – APROVAÇÃO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA

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

Of.CIBio/0222018/FCF

São Paulo, 12 de setembro de 2018.

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que em reunião da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas realizada nesta data., o Projeto "***Caracterização bioquímica e avaliação citotóxica de isoformas mutantes de L-Asparaginase II de Dickeya chrysanthemi (Erwinia chrysanthemi)"*** foi aprovado.

Atenciosamente,

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

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

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

# ANEXO L – FICHA DO ALUNO

Universidade de São Paulo **FICHA DO ALUNO** Janus

**9134 - 8725218 / 2 - Iris Munhoz Costa**

| | |
|---|---|
| **Email:** | iris.munhoz@usp.br |
| **Data de Nascimento:** | 02/05/1990 |
| **Cédula de Identidade:** | RG - 46.696.096-7 - SP |
| **Local de Nascimento:** | Estado de São Paulo |
| **Nacionalidade:** | Brasileira |
| **Graduação:** | Farmacêutica-Bioquímica - Universidade Paulista - São Paulo - Brasil - 2013 |
| **Mestrado:** | Mestra em Ciências - Área: Tecnologia de Fermentações - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2015 |

| | |
|---|---|
| **Curso:** | Doutorado |
| **Programa:** | Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica |
| **Área:** | Tecnologia de Fermentações |
| **Data de Matrícula:** | 11/01/2017 |
| **Início da Contagem de Prazo:** | 11/01/2017 |
| **Data Limite para o Depósito:** | 05/07/2022 |
| **Orientador:** | Prof(a). Dr(a). Gisele Monteiro - 11/01/2017 até o presente Email: smgisele@usp.br |

**Proficiência em Línguas:**

Inglês, Aprovado em 11/01/2017

**Licença(s) Maternidade:** null dias

Período de 12/07/2021 até 07/01/2022

**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 21/02/2019

# ANEXO L – FICHA DO ALUNO (cont.)

Universidade de São Paulo **FICHA DO ALUNO** Janus

**Data do Depósito do Trabalho:**

**Título do Trabalho:**

**Data Máxima para Aprovação da Banca:**

**Data de Aprovação da Banca:**

**Data Máxima para Defesa:**

**Data da Defesa:**

**Resultado da Defesa:**

**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 11/01/2017
Licença Maternidade em 12/07/2021
Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

**Última ocorrência:** Licença Maternidade em 12/07/2021

| Sigla | Nome da Disciplina | Início | Término | Carga Horária | Cred. | Freq. | Conc. | Exc. | Situação |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BTC5721-5/2 | Tópicos Avançados em Química de Proteínas e Peptídeos para Aplicação Biotecnológica (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo) | 07/03/2017 | 17/04/2017 | 90 | 6 | 100 | A | N | Concluída |
| FBT5738-1/5 | Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica III | 03/04/2017 | 12/06/2017 | 30 | 2 | 100 | A | N | Concluída |
| BTC5782-2/2 | Enzimologia Básica e Aplicações em Processos Industriais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo) | 29/05/2017 | 11/06/2017 | 60 | 4 | 100 | A | N | Concluída |
| FBF5805-2/4 | Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas | 03/08/2017 | 11/10/2017 | 90 | 6 | 100 | A | N | Concluída |
| BTC5755-3/7 | Seminários em Biotecnologia VI (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo) | 09/08/2017 | 21/11/2017 | 30 | 2 | 100 | A | N | Concluída |

# ANEXO L – FICHA DO ALUNO (cont.)

Universidade de São Paulo **FICHA DO ALUNO** Janus

| | Créditos mínimos exigidos | | Créditos obtidos |
|---|---|---|---|
| | Para exame de qualificação | Para depósito de tese | |
| **Disciplinas:** | 0 | 20 | 20 |
| **Estágios:** | | | |
| **Total:** | 0 | 20 | 20 |

**Créditos Atribuídos à Tese:** 167

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SCIENTIA VINCES

**Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo: https://uspdigital.usp.br/iddigital**

Documento emitido às 14:51:35 horas do dia 15/03/2022 (hora e data de Brasília)

Código de controle: MRG8-LIZD-NUY1-KI6Y

Código de controle válido até: 15/04/2022