

Caracterização funcional, estrutural e modificação racional da
ASNaseM: Um novo fármaco para o tratamento da Leucemia Linfoide
Aguda?

Leonardo Schultz da Silva

São Vicente

- 2019-

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

Campus do Litoral Paulista

Caracterização funcional, estrutural e modificação racional da
ASNaseM: Um novo fármaco para o tratamento da Leucemia Linfoide
Aguda?

Leonardo Schultz da Silva

Marcos Antonio de Oliveira

Tese apresentada ao Campus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

São Vicente

- 2019-

S586c Silva, Leonardo Schultz da
Caracterização funcional, estrutural e modificação racional da
ASNaseM: Um novo fármaco para o tratamento da Leucemia Linfóide
Aguda? / Leonardo Schultz da Silva. -- , 2019
201 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara,
Orientador: Marcos Antonio de Oliveira

1. Biotecnologia. 2. Biologia Molecular. 3. Bioquímica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA FECHADA DA TESE DE DOUTORADO DE LEONARDO SCHULTZ DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA.

Aos 10 dias do mês de abril do ano de 2019, às 14:00 horas, no(a) Sala de Videoconferência do Instituto de Biociências - UNESP/CLP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Fechada, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. MARCOS ANTÔNIO DE OLIVEIRA - Orientador(a) do(a) Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP, Profa. Dra. GISELE MONTEIRO DE SOUZA do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP, Prof. Dr. LUIZ FELIPE DOMINGUES PASSERO do(a) Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista / UNESP, Prof. Dr. GUSTAVO MARUYAMA MORI do(a) UNESP - Instituto de Biociências / Câmpus do Litoral Paulista - São Vicente / SP, Prof. Dr. ANDERSON FERREIRA DA CUNHA do(a) Departamento de Biotecnologia / UFSCAR, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição da TESE DE DOUTORADO de LEONARDO SCHULTZ DA SILVA, intitulada **Caracterização funcional, estrutural e modificação racional da ASNaseM: Um novo fármaco para o tratamento da Leucemia Linfóide Aguda?**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. MARCOS ANTÔNIO DE OLIVEIRA

Profa. Dra. GISELE MONTEIRO DE SOUZA

Prof. Dr. LUIZ FELIPE DOMINGUES PASSERO

Prof. Dr. GUSTAVO MARUYAMA MORI

Prof. Dr. ANDERSON FERREIRA DA CUNHA

Dedico este trabalho à toda minha família,
principalmente aos meus pais Rita e
Antonio, e avós Neide e Mario.

Agradecimentos

Aos membros da banca de defesa da tese, por participar da avaliação do meu trabalho, contribuindo para a qualidade da análise dos meus resultados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro (Processos: 2014/22039-9 e 2018/04685-1), ao projeto temático: Produção de L-asparaginase extracelular: da bioprospecção à engenharia de um biofármaco antileucêmico (2013/08617-7), pelo suporte financeiro para a execução deste trabalho, e ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr. pela liderança exercida no projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros – Instituto de Biociências – Campus do Litoral Paulista – São Vicente, pela formação e pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

À Universidade Estadual Paulista – Campus do Litoral Paulista, por ceder a estrutura física para a execução deste trabalho e todos os funcionários e professores.

Ao Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, por me orientar no início da pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Paul Frederick Long, pela oportunidade de realizar o estágio de pesquisa no exterior, assim como seus alunos de pós-doutorado, Dr. Liam Doonan e Dr^a. Ashlie Hartigan.

Ao Dr. Francisco Javier Medrano Martín e Dr. Carlos Alexandre Breyer pela contribuição com a construção do plasmídeo pET28PP-MBP/*asp1*.

Ao Prof. Dr. Marcos Toyama e seus alunos, do Laboratório de Química de Proteínas e Bioquímica Metabólica, pela imensa contribuição em experimentos de cromatografia de exclusão molecular e dicroísmo circular.

À Prof^a. Dr^a. Gisele Monteiro de Souza e Ms^a Iris Costa, pelas inúmeras contribuições, bem como a Prof.^a Dr^a. Sandra Farsky e Dr. Christiano Marcello Vaz Barbos, pelos ensaios de citotoxicidade por MTT.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane Ottoni e Dr^a. Patrícia Léo, pela colaboração nos ensaios de citotoxicidade por azul de tripan.

Ao Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias, pela colaboração com os ensaios de cristalização.

A todos os integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural por toda colaboração e períodos de descontração, em especial, Dr. Carlos Tairum Jr., Andrey Bragnolo e Rolando Ie, por estarem sempre presentes quando precisei.

A meus primeiros alunos de iniciação científica Werner Moura, Gabriella Fernandes e Livia Cerf Quintero, muito obrigado pela oportunidade de ensinar e aprender com vocês.

Mais um agradecimento a Livia Cerf Quintero, por toda amizade e carinho, inclusive de toda sua família.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira, por toda a orientação e ensinamentos. Não há dúvidas de que aprendi muito durante esses 9 anos de Labimes. Acredito que tudo que conquistei até aqui, devo dividir os méritos!

À todas as pessoas maravilhosas que conheci na UNESP-CLP durante minha graduação e pós-graduação, em especial a 8ª turma e a todos que já moraram na Mango.

Um agradecimento especial ao meu irmão adotivo (ou será avô?) Mormaço e sua namorada Priscila. Obrigado por toda paciência para aguentar minhas aventuras musicais e boêmias e por esses 10 anos de amizade e compartilhamento de repúblicas.

Aos meus pais, Rita e Antonio, por toda dedicação que tiveram para a minha criação e de meus irmãos e por apoiarem todas as minhas decisões. Com certeza eu só cheguei até aqui por vocês, pois se existe uma vontade em mim que é maior que qualquer outra, é tornar toda a dedicação de vocês em motivo de orgulho. Obrigado por tudo, sempre! Amo vocês!

Aos meus avós Neide e Mario, por todo amor e carinho. Espero que meu avô esteja vendo a pessoa que me tornei, por ser uma pessoa que muito admirei e me espelhei. Queria muito que estivesse ainda presente.

Aos meus irmãos Samara e Vinicius, meu sobrinho Davi Vinicius e cunhados Monika e Luís.

Agradeço também ao apoio incondicional de toda minha família de Sorocaba, Macaé e São Carlos.

“Triste época! É mais fácil desintegrar um átomo do que um preconceito.”

Albert Einstein

Resumo

L-asparaginases (ASNases) bacterianas são importantes biofármacos utilizados no tratamento de leucemia linfóide aguda (LLA), uma vez que este tipo tumoral é dependente da disponibilidade de asparagina (Asn) extracelular. As ASNases bacterianas são capazes de hidrolisar eficientemente Asn em ácido aspártico (Asp) e amônia (NH₃), diminuindo a disponibilidade de Asn para células tumorais e induzindo apoptose. Comercialmente, indústrias farmacêuticas internacionais produzem ASNases de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, entretanto, ASNase de nenhuma origem é produzida pelas indústrias farmacêuticas brasileiras. Adicionalmente, o tratamento com estas enzimas produz efeitos colaterais, entre eles imunogênicos, que estão relacionados com a alta massa molecular da enzima (140kDa) e neurológicos, atribuídos a atividade secundária de glutaminase (GLNase). Neste contexto, fontes alternativas destas enzimas e também a auto-suficiência em suas produções são importantes para mitigar os efeitos colaterais e evitar falhas no tratamento devido a flutuações internacionais de sua fabricação. Neste trabalho, realizamos a caracterização de uma ASNase de levedura, denominada de ASNaseM que compartilha elevada homologia (maior que 30% de identidade e 40% de similaridade) com as enzimas bacterianas utilizadas no tratamento da LLA e que possui todos os aminoácidos envolvidos na catálise conservados, sugerindo uma fonte alternativa potencial para o tratamento da LLA. Experimentos de cromatografia de exclusão molecular revelaram uma enzima com tempo de retenção referente a um monômero (~45 kDa), e através de espectroscopia de dicroísmo circular, foi possível observar que ASNaseM é termorresistente, mantendo sua estrutura secundária em temperaturas maiores que 40°C, apresentando $T_m = 54,35 \pm 0,37^\circ\text{C}$, o que pode ser resultado das 4 pontes de dissulfetos formados por 8 de 10 cisteínas, como observado pelo ensaio de quantificação de grupos sulfidrilas livres utilizando o reagente DTNB. Os parâmetros cinéticos foram determinados por ensaio espectrofotométrico acoplado a glutamato desidrogenase e a enzima apresentou comportamento alostérico com coeficiente de Hill = 2,125 e $S_{0,5} \sim 0,35 \text{ mM}$ e a eficiência catalítica foi na ordem de $10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e atividade específica de aproximadamente 108 UI/mg. Adicionalmente, uma característica que está relacionada com diversos efeitos colaterais, observada nas enzimas comerciais, que é a atividade secundária de GLNase, não foi detectada para ASNaseM. Através de ensaios de citotoxicidade utilizando as linhagens ReH e Molt-4 (células neoplásicas), foi possível detectar atividade citotóxica. Também foram realizadas mutações sítio dirigidas visando conferir à ASNaseM a atividade de GLNase. Também buscamos o ganho de atividade de GLNase por meio de substituições pontuais de aminoácidos que conferem ou abolem em bactérias esta atividade, entretanto, nossos resultados revelaram que as enzimas mutadas não apresentaram ganho de atividade de GLNase, o que indica que apesar das semelhanças existentes com as enzimas bacterianas, o ganho de atividade de GLNase é um fenômeno complexo e necessita de investigações adicionais. Também realizamos análises *in silico* de sequências primárias de ASNases, em conjunto com a avaliação de estruturas tridimensionais, para ampliar o conhecimento de aspectos evolutivos destas enzimas e propor uma classificação criteriosa de ASNases. Os resultados da análise revelam que a ASNase de levedura, se posiciona evolutivamente distinta de outras enzimas e também auxiliaram na identificação de ASNases que podem possuir propriedades importantes como biofármacos alternativos apresentando alta atividade de ASNase ou ausência de atividade de GLNase.

Palavras-chave: Leucemia linfoblástica aguda, Asparaginase, Biofarmacêutico

Abstract

Bacterial L-asparaginases (ASNases) are important biopharmaceuticals used in the treatment of acute lymphoid leukemia (ALL), since this tumor type is dependent on the availability of extracellular asparagine (Asn). Bacterial ASNases are able to efficiently hydrolyze Asn in aspartic acid (Asp) and ammonia (NH₃), decreasing the availability of Asn to tumor cells and inducing apoptosis. Commercially, international pharmaceutical industries produce ASNases from *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*, however none ASNase is produced by the Brazilian pharmaceutical companies. Additionally, the treatment with these enzymes can produce side effects, among them immunogenic ones, that are related to the high molecular weight of the enzyme (140kDa) and neurological, attributed to the glutaminase secondary activity (GLNase), being glutamine (Gln) the most abundant amino acid in the bloodstream. In this context, alternative sources of these enzymes as also the self-sufficiency of the production are important to mitigate side effects and avoid treatment failures due to international fluctuations in their manufacture. In this work, we performed the characterization of a yeast ASNase, called ASNaseM, which shares high homology (higher than 30% identity and 40% similarity) with the bacterial enzymes used in the treatment of ALL, and which has all the amino acids involved in the catalysis conserved, suggesting a potential alternative source for the treatment of ALL. Molecular exclusion chromatography experiments revealed an enzyme with retention time for a monomer (~ 45 kDa), and through circular dichroism spectroscopy, it was possible to observe that ASNaseM is heat-resistant, maintaining its secondary structure at temperatures higher than 40°C, presenting $T_m = 54.35 \pm 0.37$ °C, which may be the result of 4 disulfide bonds formed by 8 of 10 cysteines, as indicated by the free sulfhydryl group quantification assay using the DTNB reagent. The kinetic parameters were determined by spectrophotometric assay coupled to glutamate dehydrogenase, the enzyme presented allosteric behavior with Hill coefficient of 2.125 and $S_{0.5}$ of ~ 0.35 mM and the catalytic efficiency was in the order of $10^1 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ and activity specific of approximately 108 UI/mg. Additionally, a characteristic that is related to several side effects of the bacterial ASNases, observed in the commercial enzymes, the secondary GLNase activity was not detected to ASNaseM. Through cytotoxicity assays using ReH and Molt-4 (neoplastic cells) strains, it was possible to observe cytotoxic activity to neoplastic cells. Site-directed mutations were also performed to confer GLNase activity to ASNaseM based in known substitutions that confers or abolish this kind of activity to the bacterial enzymes. Our results revealed that the mutated enzymes showed no gain in GLNase activity, indicating that despite the similarities to the bacterial enzymes, gain of GLNase activity is a complex phenomenon and requires further investigation. In addition, we performed "*in silico*" analyzes of ASNase primary sequences, together with the evaluation of three-dimensional structures, to increase the knowledge of evolutionary aspects of these enzymes and propose a careful classification of ASNases. The results of the analysis reveal that yeast ASNase is evolutionarily distinct from other enzymes and also aided in the identification of ASNases that may possess important properties as alternative biopharmaceuticals having high ASNase activity or absence of GLNase activity.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia, Asparaginase, Biopharmaceutical

Lista de figuras

Figura 1: Mecanismo de ação das Asparaginases no tratamento de LLA.....	18
Figura 2: Estruturas cristalográficas de ASNases humanas e bacterianas.....	22
Figura 3: Resíduos do sítio ativo de ASNases bacterianas e ciclo catalítico.....	24
Figura 4: Alinhamento de sequências proteicas de ASNases.....	27
Figura 5: Comparação de estruturas de ASNases bacterianas e o modelo teórico de Asp1 de levedura.....	40
Figura 6: SDS-PAGE de Asp1 purificada e avaliação do estado oligomérico.....	41
Figura 7: Análises estruturais, T _m e temperatura e pH ótimos.....	43
Figura 8: Avaliação da atividade de asparaginase e glutaminase de ASNaseM.....	44
Figura 9: Análises da atividade de asparaginase e glutaminase de ASNaseM ^{Q228Y}	47
Figura 10: Representação de estruturas de ASNaseM contendo Gln ou Tyr na posição 228...48	
Figura 11: Caracterização de ASNaseM ^{K111Q}	49
Figura 12: Representação de estruturas de ASNaseM contendo Lys ou Gln na posição 111. 50	
Figura 13: Avaliação da atividade de asparaginase e glutaminase de ASNaseM, ASNaseM ^{T64S} e ASNaseM ^{T141S}	51
Figura 14: Representação de estruturas de ASNaseM contendo Thr ou Ser nas posições 64 e 141.....	52
Figura 15: Microcristais de Asp1-MBP e ASNaseM.....	54
Figura 16: Avaliação da citotoxicidade de ASNaseM e EcA2 no período de 48 horas.....	55
Figura 17: Avaliação da citotoxicidade de ASNaseM e EcA2 no período de 72 horas.....	56
Figura 18: Agrupamento filogenético de sequências não redundantes de ASNases.....	59
Figura 19: Árvore filogenética de máxima verossimilhança da Classe 1 de ASNases.....	60
Figura 20: Estruturas cristalográficas de monômeros de ASNases da Classe 1.....	63
Figura 21: Estruturas cristalográficas quaternárias de ASNases da Classe 1.....	64
Figura 22: Árvore filogenética de máxima verossimilhança de ASNases da Classe 2.....	65
Figura 23: Estruturas cristalográficas da cadeia polipeptídica de ASNases da Classe 2.....	68
Figura 24: Análises da estrutura quaternária de Asparaginases da classe 2.....	69
Figura 25: Árvore filogenética de máxima verossimilhança de ASNases da Classe 3.....	70
Figura 26: Modelo estrutural da ASNase da Classe 3 de <i>R. etli</i>	71
Figura 27: Resíduos do sítio ativo de ASNases bacterianas.....	73
Figura 28: Árvore filogenética de máxima verossimilhança de asparaginases de bactérias da classe 1.....	73

Figura 29: Análises do sítio ativo de ASNases bacterianas.....	75
Figura 30: Resíduos do sítio ativo de ASNases bacterianas envolvidos na seletividade do substrato.....	77
Figura 31: Árvore filogenética de máxima verossimilhança das asparaginases de vertebrados.....	79
Figura 32: Alinhamento das sequências de aminoácidos de ASNases da classe 1 de Primatas e Roedores.....	80
Figura 33: Análise de estruturas de ASNases da classe 1	82

Lista de tabelas

Tabela 1. Parâmetros cinéticos sobre ASN de ASNaseM.....	45
Tabela 2. Características funcionais e estruturais dos mutantes de ASNaseM.....	53
Tabela 3. Asparaginases da classe 1.....	62
Tabela 4. Asparaginases da classe 2.....	67

Lista de abreviaturas

AEP	Asparagina Endopeptidase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASNase	L-asparaginase
ASNS	Asparagina Sintetase
Crisantaspase	L-Asparaginase comercial de <i>Erwinia chrysanthemi</i>
EcA	L-Asparaginase de <i>Escherichia coli</i>
ErA	L-Asparaginase de <i>Erwinia chrysanthemi</i>
GLNase	L-Glutaminase
gpASNase	L-asparaginase de <i>Guinea pig</i>
hAGA	Aspartil-glucosaminidase de humano
hASNase	L-asparaginase humana
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LLA	Leucemia linfoblástica/linfoide aguda
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPD60kDa	Lisofosfolipase de 60kDa
PEG-ASNase	ASNase conjugada com polietilenoglicol
PDP	Parceria para o Desenvolvimento Produtivo
Prx	Peroxirredoxina

Sumário

1. Introdução.....	17
1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda.....	17
1.2. L-Asparaginase no tratamento da LLA	17
1.3. Aspectos da LLA e utilização da L-asparaginase no Brasil	20
1.4. Características bioquímicas e estruturais de L-asparaginases	22
1.5. Engenheiramento proteico	25
1.6. L-Asparaginases de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
1.7 Classificação das asparaginases.....	29
2 Objetivos.....	31
2.1 Objetivos gerais:	31
2.2 Objetivos específicos:.....	31
3 Materiais e Métodos	32
3.1. Reagentes:.....	32
3.2. Meios de cultura:	32
3.3. Linhagens e plasmídeos:.....	32
3.4. Mutagênese sítio dirigida:	33
3.5. Preparação e transformação de bactérias eletrocompetentes:.....	33
3.6. Oligonucleotídeos:.....	33
3.7. Expressão e purificação em bactérias de proteínas selvagens e mutantes:.....	33
3.8. Remoção da cauda de histidinas:.....	34
3.9. Quantificação de proteínas:	35
3.10. Determinação da atividade enzimática:	35
3.11. Cromatografia de exclusão molecular (SEC):	35
3.12. Espectroscopia de dicroísmo circular:.....	35
3.13. Quantificação de cisteínas livres pelo ensaio do DTNB:	35
3.14. Ensaio de cristalização	36
3.15. Ensaio de viabilidade celular:	36
3.16. Estudos filogenéticos.....	37
3.16.1. Construção do banco de dados	37
3.16.2. Reconstrução filogenética.....	37
3.16.3 Análises das sequências e clados.....	38
4 Resultados e Discussão.....	39
4.1. Caracterização estrutural e funcional da enzima recombinante Asp1 de <i>S. cerevisiae</i>	39
4.1.1. Análises estruturais e funcionais	39
4.1.2 Mutações sítio dirigidas para avaliar resíduos envolvidos com atividade GLNase	46

4.1.3 Ensaio de cristalização de Asp1-MBP e ASNaseM.....	53
4.1.4. Ensaio de citotoxicidade de ASNaseM.....	54
4.2 Variabilidade Funcional e Estrutural de Asparaginases	58
4.2.1. Estudos filogenéticos das Asparaginases	58
4.2.2 Triagem inicial e classificação de ASNases	58
4.2.3 Proteínas da Classe 1 apresentam grande diversidade e incluem enzimas utilizadas como biofármacos.....	60
4.2.4 Asparaginases da Classe 2: diversidade funcional e conservação estrutural.....	64
4.2.5 Asparaginases da Classe 3.....	69
4.2.6 Busca por determinantes estruturais relacionados a afinidade pelos substratos Asn e Gln de enzimas terapêuticas	72
5. Considerações finais	85
6. Perspectivas	86
7 Referências Bibliográficas.....	87
Apêndice A	104
Apêndice B	116
Apêndice C	118
Apêndice D	131
Apêndice E	151
Apêndice F	188

1. Introdução

1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda

Células neoplásicas se diferem das células normais do organismo por apresentarem mutações em seu genoma, o que pode gerar alterações em diversas funções celulares (Ertel *et al.*, 2006; Ghaffari *et al.*, 2015; Iacobucci; Mullighan, 2017; Malouf; Ottersbach, 2017). Fatores distintos podem levar à translocação e mutações cromossômicas, como alterações no microambiente celular devido a fatores externos, obesidade, aumento no nível de expressão de fatores de crescimento e mutações ao acaso, gerando células tumorais (Ertel *et al.*, 2006; Ghaffari *et al.*, 2015; Iacobucci; Mullighan, 2017; “Instituto Nacional do Câncer - INCA”, 2018; Malouf; Ottersbach, 2017).

Nas leucemias, as células neoplásicas são as sanguíneas, com intensa multiplicação de células das linhagens linfóide ou mieloide imaturas na corrente sanguínea. A Leucemia Linfoblástica/Linfóide Aguda (LLA) tem como principal característica o acúmulo de células imaturas (linfoblástica) anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas saudáveis como hemácias e linfócitos, podendo se espalhar para os gânglios linfáticos, baço, fígado e outros órgãos (Larson, 2014; Ustvani *et al.*, 2015). A LLA é uma doença heterogênea e conseqüentemente, necessita de múltiplas e específicas drogas para um tratamento eficiente, ainda, apresenta variabilidade clínica em razão de diferentes *backgrounds* genéticos das células leucêmicas (Avramis, 2012; Man *et al.*, 2017; Rytting *et al.*, 2017; Ustvani *et al.*, 2015). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018), a cada ano são registrados no Brasil ~10.800 novos casos de leucemia, sendo 5.940 homens e 4.860 mulheres. Dentre os casos de leucemia, a LLA é a neoplasia mais frequente na infância, correspondendo a ~26% dos casos na faixa etária até os 18 anos, com pico de incidência entre 1 e 4 anos de idade, sendo quatro vezes mais frequente que a leucemia mieloide aguda (LMA) (“Instituto Nacional do Câncer - INCA”, 2018).

1.2. L-Asparaginase no tratamento da LLA

O aminoácido L-asparagina (Asn ou N) é conhecido como não essencial, pois muitas células são capazes de sintetizá-lo através da Asparagina sintetase (ASNS), no entanto, algumas células (ex.: células do timo) dependem de fontes extracelulares de Asn para as suas atividades metabólicas, uma vez que este aminoácido é fundamental para a síntese de

proteínas e, conseqüentemente, de DNA e RNA, sendo absolutamente necessário na fase G1 da divisão celular (Ellem *et al.*, 1970; Gong; Basilico, 1990). Adicionalmente, já foi demonstrado que alguns tipos de células tumorais, dentre elas as células leucêmicas, também são dependentes da disponibilidade de Asn extracelular, por possuírem baixa ou nula expressão da enzima Asparaginase Sintetase (ASNS), responsável pela síntese de Asn intracelular (Offman *et al.*, 2011). Desta forma, a administração de L-asparaginases (ASNases) bacterianas, uma enzima que esgota a Asn do soro sanguíneo convertendo-a em aspartato (Asp) e amônia (NH_3), em pacientes com LLA, resulta em uma queda acentuada nos níveis séricos de Asn (Figura 1) (Ali *et al.*, 2016; Barba *et al.*, 2017; Jarrar *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 1969; Ollenschlager *et al.*, 1988), comprometendo a síntese de proteínas em células linfoblásticas malignas, o que inviabiliza severamente as funções celulares, resultando em apoptose (Figura 1) (Lopes *et al.*, 2017; Mehta *et al.*, 2014; Story *et al.*, 1993). Desde 1970, a ASNase tornou-se um componente essencial na quimioterapia para o tratamento de LLA infantil. Em adultos, embora a ASNase esteja incluída na maioria dos protocolos para o tratamento de linfomas, a sua utilização tem sido mais limitada e menos estudada, principalmente devido a aspectos relacionados com a toxicidade (Couturier *et al.*, 2015; Douer, 2008). Adicionalmente a atividade de asparaginase, as ASNases bacterianas apresentam atividade secundária de glutaminase (GLNase), hidrolisando o aminoácido glutamina (Gln) em glutamato (Glu) e NH_3 (Offman *et al.* 2011).

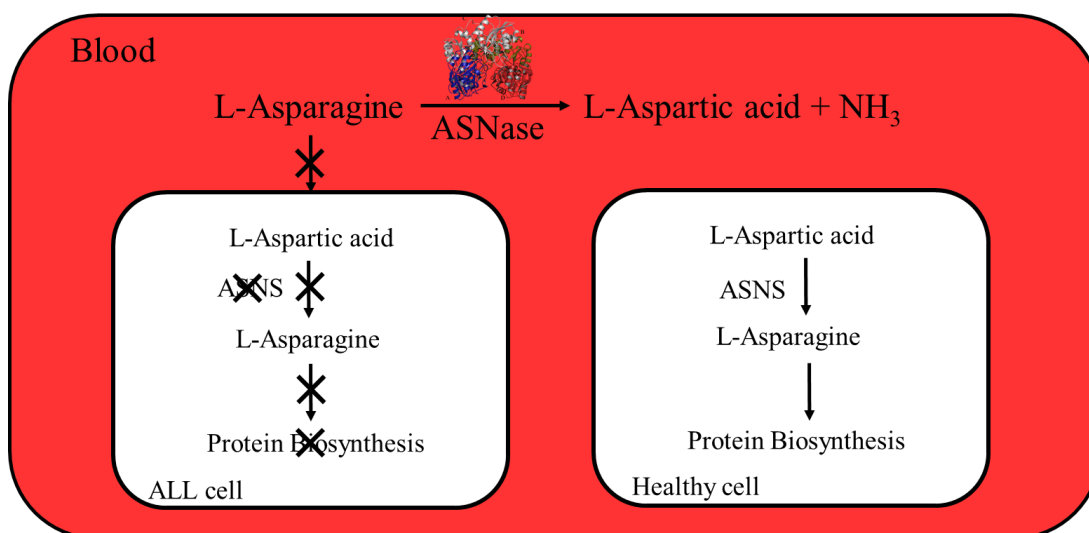


Figura 1: Mecanismo de ação das Asparaginases no tratamento de LLA. Atividade de asparaginase depleta a fonte de Asn para células de LLA, que possuem baixa ou nula expressão da enzima Asparagina Sintetase (ASNS), responsável pela biossíntese de Asn intracelular (Adaptado de Cachumba *et al.*, 2016).

Além de sua utilização no tratamento da LLA, as ASNases bacterianas também são utilizadas terapeuticamente para outros tipos de câncer do sistema linfático, doença de Hodgkin, Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Linfocítica Crônica (LLC),

reticulossarcoma e melanossarcoma (Avramis; Tiwari, 2006; Mehta *et al.*, 2014; Pui; Evans, 2006; Verma *et al.*, 2007). Adicionalmente, estudos recentes têm demonstrado que as ASNases possuem potencial terapêutico em cânceres ovarianos e pancreáticos (Dufour *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012). De fato, já se sabe que o alto peso molecular das ASNases bacterianas (~ 140kDa) limita sua utilização para o tratamento de determinados tipos de câncer (McCredie *et al.*, 1953). Estudos indicam que, no fluido cerebrospinal, a atividade de ASNase é somente na faixa de 0,1 a 0,8% da encontrada na corrente sanguínea (Asselin *et al.*, 1993; Riccardi *et al.*, 1981). Também, já foi demonstrado que o uso de ASNase potencializa os efeitos citotóxicos de agentes quimioterápicos em células de tumores cerebrais (Panosyan *et al.*, 2014). Portanto uma ASNase de menor massa molecular, em relação as ASNases bacterianas, seria altamente desejável para o tratamento de outros tipos de cânceres. Também, se postula que moléculas menores seriam menos imunogênicas e consequentemente poderiam apresentar menores efeitos colaterais (Akash *et al.*, 2015; McCredie *et al.*, 1953).

Cabe salientar que adicionalmente ao uso de ASNases, os protocolos de tratamento incluem drogas de baixa massa molar como antraciclinas, alcalóides e oxazoforinas os quais interferem de diferentes formas na proliferação celular, impedindo a montagem dos microtúbulos (Vincristina), intercalando com o DNA e interferindo na atividade da topoisomerase II (Daunorrubicina) ou promovem a alquilação de bases do DNA impedindo a ação da DNA polimerase (Ciclofosfamida) (Balendiran, 2009; Carta *et al.*, 2014; Colvin, 1999; Man *et al.*, 2017). Neste contexto, as ASNases são consideradas as drogas mais seguras dentre as utilizadas no tratamento (Douer *et al.*, 2007; Völler *et al.*, 2018).

Existem no mercado três formas de ASNases bacterianas terapeuticamente utilizadas: a ASNase nativa (EcA2) e a ASNase conjugada com polietilenoglicol (PEG-ASNase), ambas obtidas de *Escherichia coli*, e a ASNase obtida de *Erwinia chrysanthemi* (ErA2 ou Crisantaspase) (Cortijo-Cascajares *et al.*, 2012). Os três tipos possuem o mesmo mecanismo de ação, mas diferem nas suas propriedades farmacocinéticas, portanto, não é possível a intercambiabilidade com a mesma dose e frequência entre os três agentes (Rizzari *et al.*, 2013). A ASNase pode induzir resposta imune, produzindo anticorpos anti-asparaginase sendo a principal causa de resistência ao medicamento, resultando na redução de sua atividade (Armstrong *et al.*, 2007; Avramis; Panosyan, 2005; Avramis, 2012; Lopes *et al.*, 2017). As reações de hipersensibilidade, devido à produção de anticorpos, têm sido observadas em até 60% dos pacientes que fazem uso da enzima nativa derivada de *E. coli* (Panosyan *et al.*, 2004; Pui *et al.*, 2018). A alternativa, quando há reações a alguma das formulações de *E. coli*, é a

substituição por Crisantaspase, que causa reduzida estimulação do sistema imune, mas apresenta meia vida biológica menor que as de *E. coli*. Entretanto, 33% dos pacientes ainda apresentam reações alérgicas à formulação (Pieters *et al.*, 2011; Pui *et al.*, 2018; Rizzari *et al.*, 2013).

A fim de reduzir as reações imunológicas causadas pela terapia, desenvolveu-se a PEG-ASNase, a qual utiliza a enzima de *E. coli* modificada quimicamente através da ligação de moléculas de PEG que apresenta vantagem de ter um período de meia-vida biológico maior que ASNase nativa (Pieters *et al.*, 2011; Rau *et al.*, 2018; Veronese, 2001). A administração da forma peguilada de EcA2 resulta em apenas 11% de reações alérgicas, o que demonstra que a peguilação também é uma alternativa para diminuição da resposta imunológica aos tratamentos com ASNase (Pieters *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2015). Entretanto, é importante salientar que pacientes tratados com as enzimas peguiladas também podem desenvolver anticorpos anti-PEG, o que revela a necessidade da busca de novas enzimas terapêuticas (Armstrong *et al.*, 2007).

Muitas ASNases derivadas de outros micro-organismos foram caracterizadas, mas a escolha da ASNase mais adequada para o tratamento tem sido um dilema para a comunidade médica (Kavitha; Vijayalakshmi, 2012; Lebedeva; Berezov, 1997; Lubkowski *et al.*, 1996; Peterson; Ciegler, 1969). Diferenças na farmacocinética, hipersensibilidade imunológica, doses, preços, farmacodinâmica entre outros fatores são levados em consideração para a enzima ser utilizada (Kloos *et al.*, 2017; Raetz; Salzer, 2010; Rizzari *et al.*, 2013). Porém, os principais fatores que influenciam na atividade antileucêmica de uma ASNase são bioquímicos (menor K_m sobre Asn da enzima, atividade reduzida de glutaminase, dentre outros) e farmacológicos (depuração sérica da enzima, desenvolvimento de resistência à ASNase, etc.) (Avramis, 2012; Lanvers-Kaminsky, 2017).

1.3. Aspectos da LLA e utilização da L-asparaginase no Brasil

As ASNases certificadas pela ANVISA para o tratamento de neoplasias no Brasil são totalmente importadas e em 2013 se instalou uma crise devido à interrupção da produção pelo fabricante no exterior (Metck Sharp & Dohme). Neste contexto, visando evitar o desabastecimento do medicamento, foram feitos esforços no intuito de iniciar a produção do medicamento no Brasil através do Ministério da Saúde por meio de Parceria para o Desenvolvimento Produtivo (PDP) (Stumm, 2014) entre a FIOCRUZ e os laboratórios privados NT Pharma e Unitec Biotec para que, a partir de 2015, a ASNase de *E. coli* fosse

produzida nacionalmente. Entretanto em razão de diversas adversidades técnicas e burocráticas, a ASNase foi retirada da lista (INCA, 2015). Atualmente toda a ASNase utilizada no tratamento de neoplasias no Brasil era fornecida pela farmacêutica Bagó que a importava dos Estados Unidos da América (<https://www.bago.com.br/web/media/>). No entanto, em janeiro de 2017, o Ministério da Saúde gastou R\$ 3.841.851,30 para a compra de aproximadamente 30.000 frascos de asparaginase, 10.000 UI, de origem chinesa, importada pela empresa Xetley S.A.. Contudo, este medicamento gerou preocupação na comunidade médica brasileira, uma vez que o medicamento não era certificado pela ANVISA e existem suspeitas de efeitos colaterais adicionais (<http://g1.globo.com/fantastico/noticia/2017/03/ministerio-troca-laboratorio-de-remedio-de-leucemia-e-preocupa-especialistas.html>).

O quadro descrito acima demonstra a grande fragilidade no setor produtivo de biofármacos no Brasil. Cabe ressaltar que a ASNase distribuída no país é somente a de *E. coli* (AGINASA/Medac) e recentemente a PEG-ASNase (Oncaspar®) teve registro liberado pela ANVISA (<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1010&pagina=59&data=12%2F06%2F2017>). Neste contexto, a intercambialidade com a enzima de *E. chrysanthemi* não é possível, pois não possui registro da ANVISA e não pode ser comercializada no país. Entretanto, cabe ressaltar que o custo do tratamento com PEG-ASNase ou Crisantaspase é significativamente maior (entre 15-60 ×). Adicionalmente, casos reportados na mídia revelam a morte de pacientes em razão da falta de alternativas de medicamento, o que aumenta a judicialização para obtenção dos medicamentos no Brasil (<https://www.t1noticias.com.br/estado/saude-de-sophia-quinta-se-agrava-e-familia-pede-ajuda-para-conseguir-medicamento/78532/>; <http://g1.globo.com/to/tocantins/noticia/2016/09/mae-comove-nas-redes-sociais-apos-morte-de-menina-com-cancer.html>).

Pelo exposto acima, a produção do biofármaco EcA2 no Brasil seria de grande importância, mas não seria suficiente para garantir os tratamentos oncológicos pediátricos, uma vez que não haveria a possibilidade de intercambialidade com a ASNase de *E. chrysanthemi*. De fato, mesmo se a produção da enzima de *E. coli* por meio da parceria com empresas privadas se concretizar, fica uma grande lacuna por medicamentos que permitam a intercambialidade com outras enzimas, a qual, no contexto atual, são de alto custo e todas importadas. Portanto a busca por novas fontes desta enzima, visando novos biofármacos mais eficazes, é de fundamental importância estratégica não só para a saúde pública, mas também

para inserir o Brasil na classe dos países que possuem produtos biotecnológicos próprios e, também, podem auxiliar na intercambialidade das ASNases, o que pode ter impacto global.

1.4. Características bioquímicas e estruturais de L-asparaginases

O ideal para se evitar respostas imunes seria a utilização de ASNases endógenas humanas. Neste sentido, já foram identificadas três enzimas de humano capazes de hidrolisar Asn, que apresentam baixa identidade na sequência de aminoácidos com seus representantes em bactérias: aspartil-glucosaminidase (hAGA), L-asparaginase humana 3 (hASNase3) (Figura 2A e 2B) e lisofosfolipase de 60kDa (LPD60kDa) (Avramis; Tiwari, 2006; Crowther, 1971; Mononen *et al.*, 1993; Nomme *et al.*, 2013; Oininen *et al.*, 1995; Sugimoto *et al.*, 1998). No entanto, elas não apresentam potencial terapêutico uma vez que o K_m reside na faixa de milimolar, muito alto quando comparada com as enzimas bacterianas ($\sim 7,5 \times 10^{-6}$ M) (Avramis; Tiwari, 2006; Mehta *et al.*, 2014; Nomme *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2014).

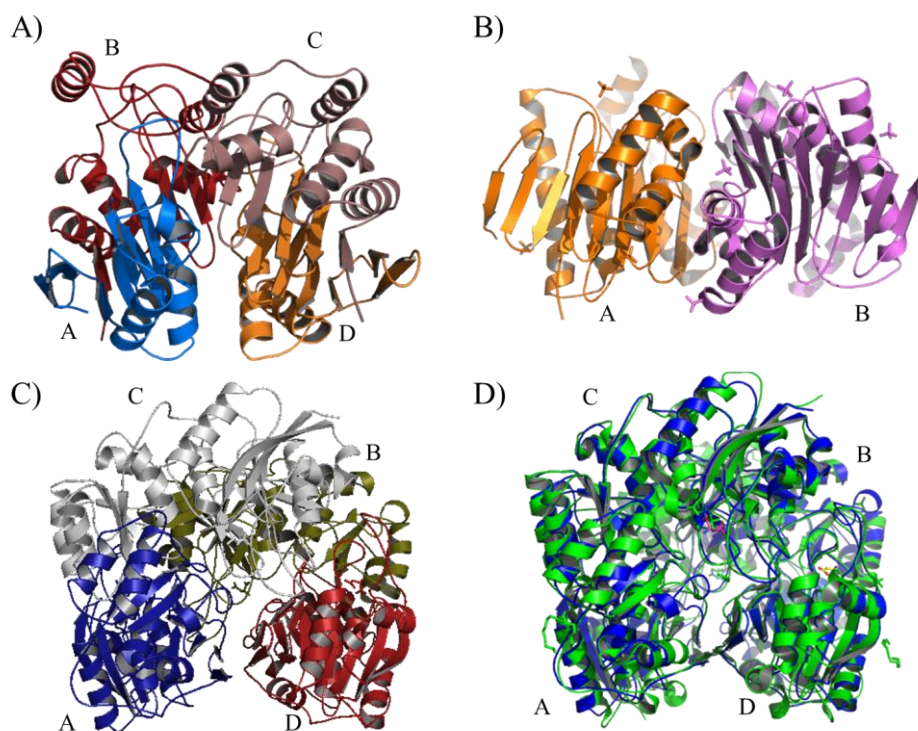


Figura 2. Estruturas cristalográficas de ASNases humanas e bacterianas. **A)** Estrutura tetramérica da enzima hAGA (código de pdb: 1APY) onde cada monômero apresenta cores distintas para uma melhor visualização (A = azul, B = vermelho, C = marrom e D = laranja). **B)** Estrutura dimérica da enzima hASNase3 (4GDU). Os monômeros estão representados em laranja e em roxo. **C)** Estrutura tetramérica da L-asparaginase 2 de *E. coli* (3ECA). A estrutura quaternária da enzima é representada por um tetrâmero e cada monômero está representado por uma cor diferente (A = azul, B= amarelo, C = branco e D = vermelho). **D)** Sobreposição das estruturas cristalográficas de ASNase2 de *E. coli* (azul, 3ECA) e de *E. chrysanthemi* (verde, 107J). Todas as representações estão em *cartoon* e as representações gráficas foram geradas com o auxílio do programa Pymol (www.pymol.org).

Uma vez que o sucesso clínico da terapia utilizando ASNase bacteriana é atribuído a baixa quantidade administrada aliada ao esgotamento rápido do aminoácido Asn no plasma, as características cinéticas das ASNases humanas as tornam inviáveis como opção terapêutica (Nomme *et al.*, 2013). Adicionalmente, a análise da estrutura de hASNase3 revelou que além da baixa afinidade por Asn, esta enzima necessita sofrer uma autoclivagem, ainda, há resíduos de treonina que estão envolvidos tanto no processo de autoclivagem quanto na atividade de ASNase da enzima, o que torna seu engenheiramento ainda mais complexo (Nomme *et al.*, 2014).

As diferenças existentes na eficiência catalítica residem, em última instância, em diferenças estruturais entre as enzimas de humanos e de bactérias. Neste sentido, a análise de estruturas cristalográficas revela que as enzimas humanas hAGA e hASNase3 (Figuras 2A e 1B) não exibem similaridade estrutural com os representantes de bactéria (Figuras 2C e 2D). De fato, a L-asparaginase 2 de *E. coli* é um tetrâmero (Figura 2C) que compartilha grande similaridade estrutural com a ASNase 2 de *E. chrysanthemi*, apresentando r.m.s.d. de 0,891 Å (Figura 2D). Adicionalmente, estruturas cristalográficas revelam que a maioria dos aminoácidos envolvidos na catálise da enzima de *E. coli* são conservados na enzima de *E. chrysanthemi* (Figura 3A e B, respectivamente). Em adição aos resíduos do ciclo catalítico, análises estruturais ressaltam a importância de um *loop* próximo ao sítio ativo no qual é mantido em uma posição produtiva para catálise por um resíduo de Tyr (Tyr25 em *E. coli*) (Offman *et al.*, 2011).

O mecanismo proposto para catálise das ASNases bacterianas é baseado em estruturas cristalográficas onde estão envolvidas duas tríades catalíticas: Thr12-Tyr25-Glu283* (o asterisco denota monômero distinto) e Thr89-Asp90-Lys162 em *E. coli* (Figura 3A) e Thr15-Tyr29-Glu63 e Thr95-Asp96-Lys168 em *E. chrysanthemi* (Figura 3B) (Lopes *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2016b). Neste contexto, com base nos resíduos do sítio catalítico da ASNase de *E. coli*, a nucleofilicidade do resíduo de Thr12 é aumentada pela formação de uma ligação de hidrogênio com o resíduo de Tyr25, uma vez que o hidrogênio do grupo OH da cadeia lateral é doado ao O da cadeia lateral do resíduo de Glu283* do monômero adjacente (Figura 3C I). É importante salientar que em *E. chrysanthemi*, o resíduo Glu63, que realiza a interação com o resíduo de tirosina, é proveniente do mesmo monômero. Adicionalmente, ao mesmo tempo em que a tríade Thr12-Tyr25-Glu283* é formada, o posicionamento da treonina 89 no sítio ativo permite a interação com o substrato, aumentando a eletrofilicidade da cadeia lateral do substrato (Figura 3C I) e também estabiliza o oxiânion formado no intermediário tetraédrico

(Figura 3C II). Posteriormente, um complexo enzima- β -aspartil é formado através da regeneração do grupo carbonila (CO) do substrato, liberando uma molécula de NH_3 , intermediada por uma molécula de H_2O e pela Tyr25 (Figura 3C III). Após a liberação do grupo NH_3 , inicia-se o processo de desacetilação da enzima com o ataque nucleofílico de uma molécula de H_2O , que possui nucleofilicidade aumentada devido a interação com a segunda tríade catalítica formada pelos resíduos Thr89-Asp90-Lys162, ao carbono do grupo CO do intermediário β -aspartil-enzima (Figura 3C IV). Por fim, a regeneração da ligação dupla do átomo de O do grupo carbonila elimina o substrato (Asp), regenerando a enzima (Figura 3C V) (Lopes *et al.*, 2017; Sanches *et al.*, 2007). Cabe ressaltar que recentemente foi determinada a estrutura da L-asparaginase 1 de *Cavia porcellus* (porquinho-da-índia) e o mecanismo catalítico proposto pelos autores reforça o modelo proposto a *E. coli* uma vez que é idêntico (Schalk *et al.*, 2016; Schalk; Lavie, 2015).

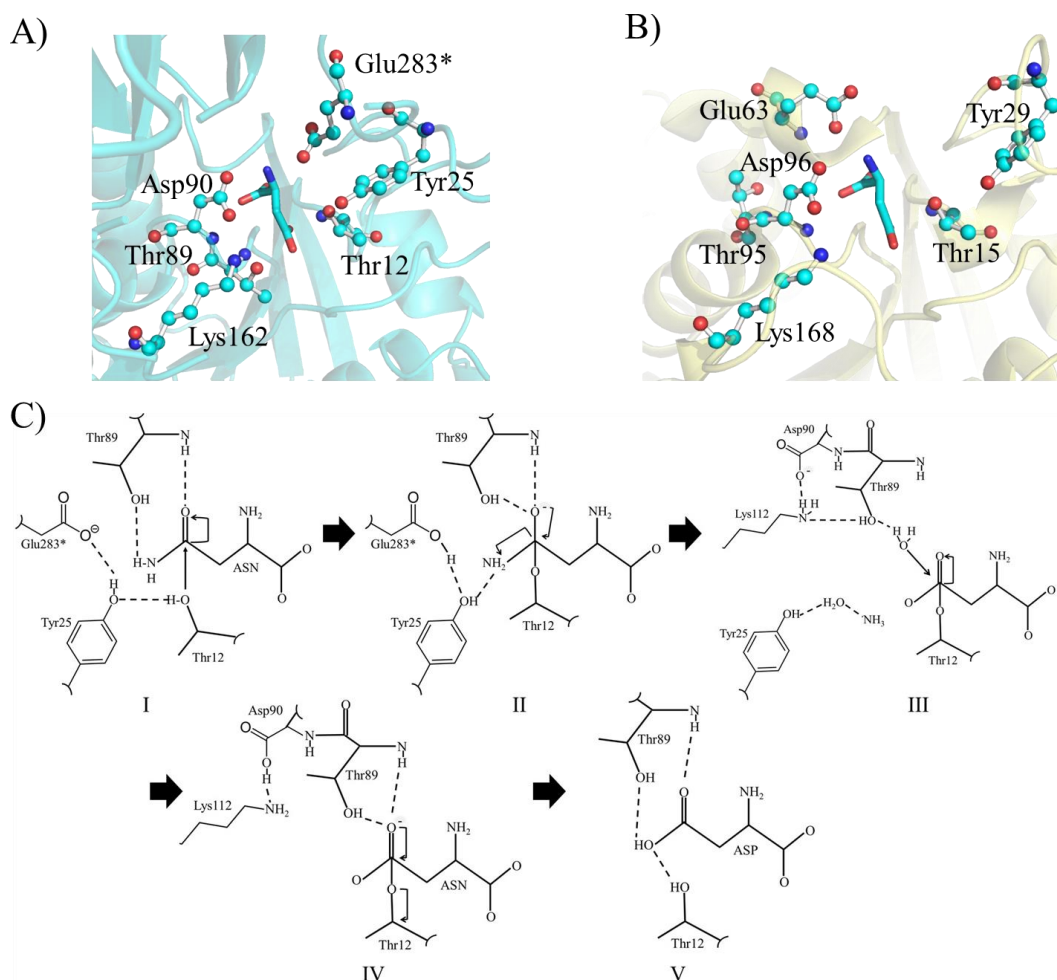


Figura 3. Resíduos do sítio ativo de ASNases bacterianas e ciclo catalítico. Região do sítio ativo de L-asparaginases de *E. coli* (PDB: 3ECA) (A) e *E. chrysanthemi* (PDB: 107J) (B) revela grande similaridade estrutural nas posições dos aminoácidos que compõe as duas tríades catalíticas. As representações estão em *cartoon* e os aminoácidos estão representados em *balls and sticks* colorizados por CPK (O = vermelho e N = azul) (www.pymol.org). C) Diagrama do mecanismo de reação das ASNases bacterianas (Adaptado de Sanches *et al.*, 2007).

1.5. Engenharia proteica

Através de estudos abrangendo dinâmica molecular e mutagênese sítio dirigidas, foram demonstrados que a substituição de determinados aminoácidos auxilia na resistência da ASNases de *E. coli* a danos proteolíticos (Chen *et al.*, 1997; Offman *et al.*, 2011; Sanches *et al.*, 2003). A substituição dos aminoácidos volumosos Tyr250 e Arg195, o primeiro na interface entre os monômeros que formam o dímero, e o segundo resíduo localizado na interface dos dímeros do tetrâmero, por aminoácidos com menor volume (Leu e Ser, respectivamente) tornam a enzima mais resistente ao ataque proteolítico, provavelmente em razão de um maior empacotamento e/ou devido à oclusão de sítios de clivagem (Offman *et al.*, 2011).

Pacientes tratados com ASNases também exibem níveis baixos de glutamina (Gln) na corrente sanguínea e alguns trabalhos destacam a relação entre o esgotamento de Gln a toxicidade das ASNases (Offman *et al.*, 2011). Apesar de o K_m para atividade de asparaginase ser significativamente menor ($30 \times$ menor em ASNase de *E. coli*) (Avramis; Tiwari, 2006), resíduos de Gln representam até 50% de todos os aminoácidos livres na corrente sanguínea humana, sendo uma fonte importante de nitrogênio para o organismo (Ollenschläger *et al.*, 1988; Ramya *et al.*, 2012). Postula-se que a principal consequência da atividade GLNase das ASNases é a diminuição da síntese de proteínas, sendo assim, associadas a vários efeitos colaterais como imunossupressão, tromboembolia e doenças neurológicas (Kafkewitz; Bendich, 1983; Ramya *et al.*, 2012; Villa *et al.*, 1986).

Chan e colaboradores (2014), utilizando abordagens de dinâmica molecular e mutação sítio dirigida, identificou um resíduo de glutamina (Gln59) na ASNase de *E. coli*, encontrada na cavidade do sítio ativo, que não está diretamente relacionado com a atividade catalítica, no entanto realiza interações com o ligante. Os autores demonstraram que a enzima mutante que carrega a substituição Gln59 por uma leucina (Leu) (ASNase^{Q59L}) leva a um decréscimo da atividade enzimática sobre asparagina de ~60% em relação ao tipo selvagem, entretanto, atividade de GLNase é apenas residual (Chan *et al.*, 2014). Posteriormente, Mehta e colaboradores (2014) demonstraram que a substituição do resíduo Tyr176 por uma Phe resulta em uma enzima de atividade de ASNase inalterada, mas a atividade de GLNase indetectável. Os autores também demonstraram que a enzima mutante possui atividade citotóxica (antitumoral) superior à da enzima selvagem e também apresenta reduzida imunogenicidade. Entretanto, vale salientar que alguns autores postulam que a atividade secundária de GLNase

também é importante para a atividade citotóxica das ASNases bacterianas (Offman *et al.*, 2011).

Como demonstrado acima, abordagens envolvendo mutagênese sítio dirigida são de grande importância na modulação da atividade ou estabilidade das enzimas. De fato, já foram demonstradas para um outro grupo de enzimas, as peroxirredoxinas (Prx), peroxidases capazes de decompor diferentes peróxidos como H_2O_2 e peróxidos orgânicos, onde ocorre um resíduo de Thr que compõe a tríade catalítica, que as enzimas selvagens têm menor afinidade por peróxidos orgânicos, entretanto, quando há a substituição do resíduo de Thr por Ser nas Prxs, há um aumento da eficiência na decomposição de peróxido orgânico (Flohé *et al.*, 2002; Netto *et al.*, 2015; Tairum-Jr *et al.*, 2016; Tairum-Jr *et al.*, 2012). Em ASNase de *E. coli*, já foi demonstrado que a substituição de Thr12 por Ser, afeta o K_m da ASNase sobre Asn (Derst *et al.*, 1992). Sendo assim, a presença dos resíduos de Thr entre os resíduos catalíticos de ASNases (Thr12 ou Thr89 em *E. coli*) são alvos potenciais para mutações sítio dirigidas por resíduos de serina, que podem alterar sua eficiência catalítica sobre substratos, diminuindo sua afinidade por glutamina ou aumentando sua afinidade por asparagina.

1.6. L-Asparaginases de *Saccharomyces cerevisiae*

Uma vez que a utilização de ASNases bacterianas no tratamento de LLA está relacionada com diversos efeitos colaterais, uma alternativa terapêutica promissora é a utilização de enzimas de outros organismos com características superiores as de ASNases bacterianas, como maior eficiência catalítica, maior permanência no organismo e menores efeitos colaterais. A revisão da literatura revela que duas isoformas de ASNases de *S. cerevisiae* (Asp1 e Asp3, seguindo a nomenclatura do *Saccharomyces Genome Database*: <http://www.yeastgenome.org>) tiveram sua caracterização bioquímica efetuada na década de 1970 (Dunlop; Roon, 1975; Dunlop *et al.*, 1978; Jones, 1977). Entretanto, nos trabalhos mencionados acima, os autores trabalharam com isoformas purificadas diretamente de culturas de *S. cerevisiae*, e a análise dos trabalhos revela que as enzimas purificadas continham diversos contaminantes, o que torna questionável os resultados obtidos. Portanto, até o início desta investigação nenhum trabalho tinha efetuado uma caracterização funcional acurada destas ASNases e trabalhos referentes à caracterização estrutural das enzimas são inexistentes (Dunlop *et al.*, 1978). Adicionalmente, trabalhos recentes que envolvem a caracterização das enzimas Asp1 e Asp3, dois deles desenvolvidos pelo projeto Temático "Produção de L-asparaginase extracelular: da bioprospecção à engenharia de um biofármaco

antileucêmico", do qual nosso grupo de pesquisa faz parte, foram publicados (Costa *et al.*, 2016 - Apêndice A; Girão *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2017).

Neste trabalho, centramos nossa atenção na isoforma Asp1, por motivos que serão expostos a seguir. Quando a sequência proteica de Asp1 de levedura é comparada com as isoformas bacterianas de *E. coli* e *E. chrysanthemi*, são detectadas semelhanças na estrutura primária (~ 38% de identidade e ~ 54% de similaridade) (Figura 4A). Também é possível constatar que os aminoácidos envolvidos na atividade sobre Asn das ASNases se encontram estritamente conservados em Asp1 de *S. cerevisiae* (Figura 4A). Cabe ressaltar que, no alinhamento apresentado na figura 3, os primeiros 20-25 aminoácidos N-terminais (N-T) das enzimas bacterianas representam um peptídeo sinal para o periplasma bacteriano o qual é ausente na proteína madura. Outra diferença marcante recai nos resíduos de Gln59 e Tyr176 (Figura 4 A – indicadas por setas pretas) da ASNase de *E. coli*, que quando mutados por Leu e Phe, respectivamente, resultam em uma atividade de glutaminase reduzida ou ausente (Chan *et al.*, 2014; Mehta *et al.*, 2014). Em Asp1 de *S. cerevisiae*, estes resíduos são naturalmente substituídos por lisina (111) e glutamina (228), respectivamente, o que indicaria uma atividade reduzida sobre glutamina.



Figura 4. Alinhamento de sequências proteicas de ASNases. As sequências das proteínas foram obtidas junto aos bancos de dados SGD (<http://www.yeastgenome.org>) e Uniprot (<http://www.uniprot.org>), alinhadas utilizando o programa Clustal Ω (Sievers *et al.*, 2011) e a representação gráfica foi obtida com o auxílio do programa Jalview (Clamp *et al.*, 2004). **A)** Alinhamento de sequências proteicas de ASNases bacterianas e Asp1 de levedura. Em cinza escuro estão realçados os aminoácidos estritamente conservados e em cinza claro aminoácidos que apresentam propriedades físico-químicas ou espaciais semelhantes. As caixas pretas verticais representam aminoácidos que compõem as tríades catalíticas em *E. coli* (Thr12, Tyr25, Thr89, Asp90, Lys162 e Glu283), em *E. chrysanthemi* (Thr15, Tyr29, Glu63, Thr95, Asp96 e Lys168) e Asp1 (Thr64, Tyr78, Lys111,

Thr141, Asp142 e Lys215). As setas denotam o resíduo de Gln e Tyr de ASNase de *E. coli*, que quando substituído, resulta em uma baixa atividade sobre L-glutamina e os asteriscos laranjas indicam os resíduos de cisteínas em Asp1. As abreviações para as enzimas bacterianas são: ECA2 = L-asparaginase 2 de *Escherichia coli* (número de acesso Uniprot = P00805), ErA2 = L-asparaginase 2 de *Erwinia chrysanthemi* (P06608) e Asp1 = L-asparaginase 1 de *Saccharomyces cerevisiae* (P38986). **B)** Alinhamento da região N-terminal (~50 a.a.) de sequências proteicas de ASNases de levedura e bacterianas. Em cinza escuro estão realçados os aminoácidos estritamente conservados entre as asparaginases e em cinza claro aminoácidos que apresentam propriedades físico-químicas ou espaciais semelhantes. As abreviações são: Asp1_ *S. cerevisiae* = L-asparaginase 1 de *Saccharomyces cerevisiae* (número de acesso Uniprot = P38986), AspKM_ *K. marxianus* = L-asparaginase de *Kluyveromyces marxianus* (Acesso = BAO40999.1), AspKD_ *K. dobzhanskii* = unnamed protein product de *Kluyveromyces dobzhanskii* (Acesso = CDO93849.1), AspA_ *G. gossypii* = *Ashbya gossypii* (Acesso GenBank = NC_005788), AspZR_ *Z. rouxii* = uncharacterized Glutaminase/Asparaginase de *Zygosaccharomyces rouxii* (Acesso GenBank = XP_002496902.1), AspKN_ *K. naganishii* = Uncharacterized Glutaminase/Asparaginase de *Kazachstania naganishii* (Acesso GeneBank = 403215145), AspKA_ *K. africana* = *Kazachstania africana* (Acesso GenBank = XP_003956310.1), AspND_ *N. dairenensis* = hypothetical protein de *Naumovozyma dairenensis* (Acesso GenBank = NDAI0C04340), ECA_ *E. coli* = L-asparaginase 2 de *Escherichia coli* (número de acesso Uniprot = P00805) e ErA_ *E. chrysanthemi* = L-asparaginase 2 de *Erwinia chrysanthemi* (P06608).

Por outro lado, uma vez que autores ressaltam que atividade de glutaminase é importante para citotoxicidade (Chan *et al.*, 2014; Offman *et al.*, 2011), uma abordagem interessante seria substituir os resíduos de Lys111 e Gln228 por Gln e Tyr, respectivamente. Adicionalmente, a sequência primária de Asp1 revela a presença de resíduos de cisteínas (dez), uma característica bastante importante, pois a formação de um dissulfeto na ASNase de *E. coli* está relacionado com a estabilidade da enzima (Papageorgiou *et al.*, 2008). Neste sentido, as cisteínas em Asp1 podem resultar na formação de dissulfetos, o que pode conferir maior estabilidade a enzima.

No entanto, apesar das semelhanças estruturais e funcionais de Asp1 com as ASNases bacterianas comerciais, em Asp1 é possível observar uma região N-terminal contendo aproximadamente 50 aminoácidos, com função não conhecida, que é conservada em apenas um pequeno grupo de leveduras (<30 espécies) (Figura 4B) e ausente nas isoformas bacterianas (Figura 4 A e B). Análises *in silico* utilizando os *softwares* SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), PredisSi (<http://www.predisi.de>) ou Signal-BLAST (<http://sigpep.services.came.sbg.ac.at/signalblast.html>) não indicaram representar um peptídeo sinal semelhante aos presentes nos bancos de dados. Nossos experimentos de cromatografia de exclusão molecular, em condições específicas de expressão, possibilitaram obter uma enzima em estado oligomérico monomérico, característica nunca descrita na literatura para uma ASNase. Sabe-se que o sítio ativo das enzimas bacterianas está localizado na interface entre dímeros íntimos (Sanches *et al.*, 2007; Offman *et al.*, 2011), e uma diferença na cadeia primária de aminoácidos de aproximadamente 50 aminoácidos poderia ocasionar em alterações estruturais ASNase significativas.

Estudos relativos à localização de Asp1 datam da década de 1970 e estudos mais recentes de proteínas em *S. cerevisiae* falham em detectar Asp1 quando fusionada com *green fluorescent protein* (GFP) (<https://yeastgfp.yeastgenome.org>) (Huh *et al.*, 2003). Logo, estudos envolvendo análises da cauda N-terminal da enzima Asp1 poderiam elucidar a função e a importância destes aminoácidos presentes na região N-terminal. Os dados apresentados neste trabalho sugerem que Asp1 apresenta grande semelhança com seus representantes de bactérias e que a tornam uma alternativa importante para o tratamento da LLA e também apresenta características diferentes das enzimas caracterizadas, como a presença da cauda N-terminal observada em um pequeno grupo de leveduras (~30 espécies), que são classificadas em 3 famílias diferentes de asparaginases, revelando uma maior biodiversidade.

1.7 Classificação das asparaginases

Atualmente, as enzimas que possuem atividade de asparaginase são subdivididas em três famílias, com base em alinhamentos de sequências, propriedades bioquímicas e dados cristalográficos: asparaginases do tipo planta, asparaginase do tipo *Rhizobium etli* e asparaginases de tipo bacteriano (Borek; Jaskólski, 2001; Michalska; Jaskolski, 2006). As asparaginases de tipo bacteriano são divididas em tipo I, enzimas citosólicas que são expressas constitutivamente e com baixa afinidade para Asn; e enzimas do tipo II, com expressão induzida durante a anaerobiose e com alta afinidade por Asn (Michalska; Jaskolski, 2006; Schalk *et al.*, 2014). No entanto, a classificação atual é um fator limitante para a seleção de enzimas potenciais para uso biotecnológico.

Como apontado por Michalska e Jaskolski em 2006, a terminologia utilizada para classificar as ASNases é muito confusa, uma vez que na família bacteriana estão incluídas algumas enzimas de arquea e eucariotos, e na família do tipo planta há enzimas mais ativas sobre β -aspartil peptídeos (um dos danos em ligações peptídicas não enzimáticos mais comuns em condições fisiológicas), mas que apresenta K_m sob Asn muito elevado para finalidades terapêuticas (3,4 mM) (Cantor *et al.*, 2009). Além disso, a diversidade de ASNases pode ser muito maior do que a considerada em estudos evolutivos e filogenéticos e características peculiares, como, por exemplo, a presença de uma cauda N-terminal de ~50 aminoácidos, presente em um grupo de leveduras (~30 espécies) não são consideradas.

Contudo, estudos evolutivos /filogenéticos poderiam auxiliar a propor uma classificação mais robusta e identificação de novos grupos de ASNases com potenciais

características terapêuticas. Como exemplo, as ASNases 2 de *E. coli* (EcA2) e *E. chrysanthemi* (ErA2), apesar de compartilhar grande similaridade e apresentarem K_m similar (15 e 50 μM , respectivamente) (Nguyen *et al.*, 2016a), em uma das duas tríades catalíticas pode ter a participação de um resíduo do monômero adjacente ou não (Aghaiypour *et al.*, 2001), além de possuir ou não dissulfetos estruturais (Swain *et al.*, 1993). Ainda, o K_m de enzimas de micro-organismos muito similares a EcA2 e ErA2 pode se apresentar muito mais elevado, como as de *Bacillus subtilis* (0,43 mM) (Jia *et al.*, 2013), *Bacillus megaterium* (0,2 mM) (Pal Roy *et al.*, 2018), *Bacillus tequilensis* (0,07 mM) (Shakambari *et al.*, 2018), *Cylindrocarpon obtusisporum* (1 mM) (Raha *et al.*, 1990), *Helicobacter pylori* (0,29 mM) (Maggi *et al.*, 2015), *Pseudomonas stutzeri* (14 mM) (Manna *et al.*, 1995), *Streptomyces fradiae* (1 mM) (El-Naggar *et al.*, 2016) entre outros. Entretanto, as razões que levam a estas diferenças permanecem elusivas.

Adicionalmente, apesar de ter sido descoberta na década de 50 (Kidd, 1953), somente em 2014 foi identificada e caracterizada a ASNase de *Cavia porcellus* (porquinho-da-índia) que possui atividade antineoplásica (Schalk *et al.*, 2014). E com isto, mais recentemente foi possível identificar inequivocamente a enzima homóloga de humanos hASNase1 (69,8% de identidade e 88,6% de similaridade) (Rigouin *et al.*, 2017). Entretanto a caracterização cinética revela que enquanto a enzima de *C. porcellus* possui comportamento Michaeliano e K_m de 50 μM , a enzima de humanos possui comportamento alostérico e $S_{0.5}$ (fator similar ao K_m) na faixa de milimolar. Os autores demonstraram que as diferenças de afinidade pelo substrato estão localizadas em 2 regiões presentes da enzima, e que mutações nestas regiões são capazes de acentuar a atividade de hASNase1 (Rigouin *et al.*, 2017). De forma geral, os dados apresentados acima indicam que as asparaginases possuem alta diversidade e características estruturais distintas que estão relacionadas com sua atividade e afinidade pelos substratos. No entanto, até o presente momento, nenhum trabalho atentou para uma identificação acurada dos fatores que governam estas diferenças.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais:

Os objetivos deste trabalho foram de caracterizar estruturalmente e funcionalmente Asp1 de *S. cerevisiae*, utilizando ferramentas como expressão recombinante, análises mutacionais e computacionais envolvendo a estrutura primária, terciária e aspectos evolutivos da enzima.

2.2 Objetivos específicos:

- 1) Caracterização estrutural e funcional da enzima recombinante Asp1 de *S. cerevisiae*.
- 2) Investigação da variabilidade funcional e estrutural das Asparaginases.

3 Materiais e Métodos

3.1. Reagentes:

Para o desenvolvimento do projeto, foram utilizados reagentes adquiridos junto à Sigma, Merck, Thermo Scientific e GE Healthcare.

3.2. Meios de cultura:

No processo de expressão das proteínas, foram utilizados os seguintes meios de cultura para bactérias: Meio LB (1% triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 0,5% NaCl) e meio SOC (2% triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 0,058% NaCl; 0,018% KCl; [glicose] final de 20mM; pH7) que foi utilizado após o processo de eletroporação das bactérias. Quando o meio teve como finalidade a seleção, foram adicionados 50 µg/ml de canamicina. Os meios sólidos foram obtidos com a adição de 2% de Ágar.

3.3. Linhagens e plasmídeos:

Linhagens de *E. coli* para clonagem e manipulação de DNA:

DH5α: Linhagem de clonagem com múltiplas mutações que permitem transformações de alta eficiência. Uma característica importante é uma mutação *endA* que inativa uma endonuclease que degrada o plasmídeo intracelular e mutação em *recA* que inibe a recombinação homóloga. Genótipo: F- ϕ 80d *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *end A1 recA1 hsdR17* (*rk-*, *mk+*) *supE44* λ - *thi-1 gyrA96relA1 phoA*.

XL1-Blue: Também possui mutação em *endA* e *recA* evitando que a endonuclease degrade o plasmídeo e que haja recombinação. A mutação *hsdR* impede a clivagem do DNA clonado pelo sistema endonuclease *EcoK*. Genótipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIq* Δ M15 Tn10 (Tetr)].

Linhagens de *E. coli* para expressão:

BL21 (DE3) C43: Efetiva na expressão de proteínas tóxicas e de membrana de todas as classes de organismos. Esta linhagem possui mutações não caracterizadas que a torna resistente à expressão de diversas proteínas recombinantes tóxicas. Genótipo: F⁻ *ompT gal dcm hsdS_B* (*r_B*⁻ *m_B*⁻)(DE3).

Origami (DE3) (EMD Millipore): São derivados de K-12 e apresentam mutações na tiorredoxina redutase (*trxB*) e glutathione redutase (*gor*), genes envolvidos em *pathways* redutores e cujas mutações favorecem fortemente a formação de ligações dissulfeto no citoplasma da bactéria. Genótipo: $F^- omp ThsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1 ahpC gor522: Tn10 trxB$ (Kan^R, Tet^R).

Para os procedimentos envolvendo clonagem foram utilizados os plasmídeos *p-GEM-T* (Promega) ou *pTZ-rt* (Fermentas) e para expressão em bactérias, os vetores *pET15b* (gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Gisele Monteiro de Souza e Ms^a Iris Costa – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP) (Novagen-Sigma Aldrich), *pET28-PP-MBP* (gentilmente cedido pelo Dr. Javier Medrano CIB -Madrid).

3.4. Mutagênese sítio dirigida:

As mutações foram efetuadas utilizando o kit QuickChange II (Stratagene), seguindo as orientações do fabricante. A confirmação das mutações foi efetuada em sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser (Thermoscientific), utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing (Thermoscientific).

3.5. Preparação e transformação de bactérias eletrocompetentes:

Os procedimentos para a preparação e transformação de bactérias eletrocompetentes foram realizados de acordo (Ausubel *et al.*, 2003).

3.6. Oligonucleotídeos:

Asp1^{T64S}_F - 5'ACC GGT GGT TCT ATT GCA TCG3'; Asp1^{T64S}_R - 5'CGA TGC AAT AGA ACC ACC GGT3'; Asp1^{T141S}_F - 5'ACC CAT GGG TCT GAT ACG CTA3'; Asp1^{T141S}_R - 5'TAG CGT ATC AGA CCC ATG GGT3'; Asp1^{K111Q}_F - 5'GTG GAT TCT CAG GAC ATA AAC3'; Asp1^{K111Q}_R - 5'GTT TAT GTC CTG AGA ATC CAC3'; Asp1^{Q228Y}_F - 5'AAT GTT AGA TATGGC TAT TTA3'; Asp1^{Q228Y}_R - 5'TAA ATA GCC ATA TCT AAC ATT3'.

3.7. Expressão e purificação em bactérias de proteínas selvagens e mutantes:

Inicialmente, as diferentes linhagens de *E. coli* contendo o plasmídeo *pET15B/asp1* ou *pET28PP-MBP/asp1* foram inoculadas em 20 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de

ampicilina (pET15B) ou 30 µg/ml de canamicina (pET28PP-MBP), e cultivadas por 16h/37°C/250rpm em agitador orbital. Posteriormente, a cultura foi transferida para 500ml de meio LB com o antibiótico apropriado, e cultivadas até OD₆₀₀= 0,6 e, neste momento, adicionado IPTG para concentração final de 0,3 mM. Após 16 horas/16°C de expressão, as células foram decantadas por meio de centrifugação 30 min/4 °C/4.000 rpm e ressuspensas em tampão Tris 50mM, pH=7,4, NaCl 0,2 M. O rompimento das células foi por sonicação (30% amplitude) e os ácidos nucléicos foram removidos por meio de tratamento com sulfato de estreptomicina (concentração final = 1%) por 20 minutos. Após este período, o extrato foi centrifugado por 45 min/4 °C/18.500g, e os extratos proteicos livres de ácidos nucléicos foram coletados. Uma vez que as proteínas foram expressas em vetores que adicionam cauda de histidina, foi realizada a purificação por cromatografia de afinidade por metais em colunas His-trap (GE Healthcare) em gradiente de Imidazol. A qualidade da purificação foi constatada por SDS-PAGE em condições redutoras. Após estes procedimentos, as proteínas foram dessalinizadas através de cromatografia de filtração em gel utilizando a coluna PD10 (GE Healthcare) e quantificadas para posterior remoção da cauda de histidina, e quando utilizamos o pET28PP-MBP, para remoção da MBP e cauda de histidina.

3.8. Remoção da cauda de histidinas:

Uma vez que adjacente a cauda de histidinas das proteínas recombinantes é inserido um sítio para trombina (pET15b) ou sítio para HRV3C protease (pET28PP-MBP), as caudas foram removidas utilizando, respectivamente, o kit *Thrombin Clean Cleave* (Sigma) seguindo as orientações do fabricante, ou utilizando a enzima HRV3C protease recombinante, produzida em nosso laboratório, sendo o tratamento realizado na proporção de 1:100 de protease durante 16 horas, a 4°C, e posteriormente, realizada nova purificação por cromatografia de afinidade por metais em colunas His-trap (GE Healthcare) em gradiente de imidazol, sendo que a enzima sem cauda e sem MBP é recuperada nas frações 5 e 20 mM de imidazol. A qualidade da purificação foi constatada por SDS-PAGE em condições redutoras. Após estes procedimentos, as proteínas foram dessalinizadas através de cromatografia de filtração em gel utilizando a coluna PD10 (GE Healthcare) e concentradas por centrifugação (4.000 rpm/4 °C) utilizando concentradores Ultracel YM-30 (Millipore) por período variável até uma concentração final de ~1 – 10 mg/ml.

3.9. Quantificação de proteínas:

As proteínas purificadas neste trabalho foram quantificadas através do coeficiente de extinção (<http://www.expasy.org/tools/protparam>).

3.10. Determinação da atividade enzimática:

Os parâmetros cinéticos sobre Asn e Gln de Asp1 foram avaliados através do ensaio espectrofotométrico acoplado a Glutamato desidrogenase, que acompanha o consumo de NADH a 340 nm, adaptado de Balcão *et al.* (2001). A atividade específica de Asp1 para Asn foi determinado através do ensaio colorimétrico utilizando o reagente Nessler, de acordo com o protocolo desenvolvido pelo fabricante (Sigma).

3.11. Cromatografia de exclusão molecular (SEC):

O estado oligomérico das enzimas foi analisado por HPLC analítico utilizando sistema Jasco série vp. equipado com bomba PU 2880 Plus, forno de coluna CO 2065, detector PDA MD 2018 e detectores de fluorescência FP 2020 Plus. Foram utilizadas colunas Phenomenex BioSep-SEC-S3000 (7.8 × 300 mm, 5 cm, faixa de separação 5 a 700 kDa), equilibradas com Tris-Cl 100 mM pH 7,4 contendo 100 mM de NaCl. A eluição dos componentes foi monitorada por UV ($\lambda = 280$ nm) e por fluorescência ($\lambda_{\text{ex}}=280$ e $\lambda_{\text{em}}=330$ nm). Os padrões de massa molecular utilizados foram: tiroglobulina (bovina) (670 kDa), γ -globulina (bovina) (158 kDa), ovalbumina (frango) (44 kDa), mioglobina (cavalo) (17 kDa) e vitamina B₁₂ (14,2 kDa) (BioRad).

3.12. Espectroscopia de dicroísmo circular:

A determinação da temperatura de desnaturação das enzimas (T_m = *Thermal Melting*) foi realizada através do monitoramento da dissociação de α -hélices a 220 nm em gradiente de temperatura 20 – 90 °C, com um incremento de 2 °C × min⁻¹. O T_m foi calculado foi calculado ajustando a curva sigmoidal de fusão à equação de Boltzmann usando GraphPad Prism, com valores de $R^2 > 0,98$.

3.13. Quantificação de cisteínas livres pelo ensaio do DTNB:

O produto resultante da reação de tiol (R-SH) ou tiolato (R-S⁻) com DTNB, ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) gera o composto tionitrobenzonato (TNB), que pode ser

quantificado por espectrofotometria a 412 nm. Neste contexto, o teor de grupos sulfidrilas livres foi avaliado, utilizando 20 μM de enzima, em volume final de 100 μL em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7.0, EDTA 1 mM (tampão não desnaturante), ou tampão Tris-HCl 30 mM pH 7.0, EDTA 1 mM e 8 M de Uréia (tampão desnaturante), e foi adicionado DTNB para concentração final de 200 μM e a amostra foi incubada no escuro por 15 min/RT. A absorbância do TNB foi registrada em $\lambda=412$ nm e o coeficiente de extinção molar de 13.600 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ foi utilizado para determinar a concentração final de TNB. Adicionalmente, uma curva de calibração utilizando concentrações diferentes de DTT foi realizada para a determinação do número de cisteínas livres na asparaginase 1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.14. Ensaios de cristalização

Paras os ensaios de cristalização, foram utilizadas as enzimas ASNaseM e também Asp1-MBP (fusionada com MBP). Com colaboração do Prof. Dr. Marcio Vinícius Bertacine Dias, os ensaios de crescimento de microcristais foram realizados utilizando o robô Oryx4 (Douglas Instruments) e os kits Crystal Screen (Hampton Research - 96 condições), JCSG (Nextal/Qiagen - 96 condições), Classic 1 – 4, Classic 5 – 8 e Basic 1 - 4 (JBScreen Classic – 96 condições cada) seguindo as orientações dos fabricantes, pelo método de gota sentada a 16°C. Para cada enzima, a concentração utilizada foi de 10 mg/ml em tampão Tris-HCl 5mM.

3.15. Ensaios de viabilidade celular:

As linhagens humanas leucêmicas MOLT4 (ASNS⁻) e REH (ASNS⁺) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ). As células foram mantidas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (v/v) e incubadas a 37 °C em incubadora a 5% de CO₂. Após atingirem a confluência, as linhagens foram centrifugadas a 280 × g a temperatura ambiente, durante 10 min e ressuspensas em meio DMEM fresco contendo 10% de soro fetal bovino (v/v). Para calcular a concentração citotóxica (CC₅₀), em microplacas de 96 poços foram incubadas 20⁴ células, tratadas com 8 diferentes concentrações de ASNaseM (0; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 unidades/ml) e comercial (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,6 e 1 unidades/ml) em tampão Tris-HCl pH 7,4, por 48 e 72 horas, à 37°C com 5% CO₂. Após o período de incubação, foram adicionados uma solução contendo MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil tetrazolium) 0,25 mg/ml e após 4 horas, SDS 1% e incubadas nas mesmas condições por mais 24 horas. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro à 540 nm.

3.16. Estudos filogenéticos

3.16.1. Construção do banco de dados

Com base em trabalhos prévios realizados por Borek *et al*, 2001 e Dwivedi e Mishra, 2014, inicialmente, foram selecionadas 337 sequências de aminoácidos de ASNases não redundantes de arquea, bactérias, eucariotos, fungos, metazoários e plantas em bancos de dados de proteínas disponíveis no NCBI e UniProt. Além das sequências utilizadas nos trabalhos citados acima, adotamos alguns critérios de seleção: 1) sequências revisadas de ASNases disponíveis no UniProt; 2) sequências de organismos modelos (ex: *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*); 3) representantes de grandes taxas (ex: diversas sequências de plantas, mamíferos, cnidários, etc.). O alinhamento múltiplo de sequências das enzimas selecionadas foi realizado utilizando o software MAFFT v.7.402 (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*) (Katoh; Standley, 2013) utilizando a ferramenta de bioinformática Geneious (Kearse *et al.*, 2012), posteriormente, o alinhamento foi submetido ao InterProScan (Jones *et al.*, 2014) para encontrar domínios de cada sequência, também utilizando o programa Geneious (Kearse *et al.*, 2012). Em seguida, a lista de sequências foi dividida em três grupos, utilizando como critério a anotação gerada pelo InterProScan (Jones *et al.*, 2014), e as três listas foram analisadas separadamente. Para realizar as análises dos clados que contém enzimas similares, mas com K_m muito diferentes ou apresentaram diferenças estruturais (ex: inserções ou deleções de aminoácidos), duas novas árvores foram construídas, uma utilizando 133 sequências de aminoácidos de ASNases com 90% de similaridade com ASNases humanas e de porquinho-da-índia, e a segunda árvore utilizando 56 sequências de aminoácidos de ASNases com mais de 60% de similaridade com as ASNases de EcA2 e ErA2, totalizando 526 sequências de ASNases analisadas no trabalho.

3.16.2. Reconstrução filogenética

O programa ProtTest 3 (Darriba *et al.*, 2017) foi utilizado para selecionar o melhor modelo para a substituição de aminoácidos, e o modelo foi aplicado a todas as análises filogenéticas. Os modelos utilizados foram: LG (Le; Gascuel, 2008) que incorpora a variabilidade de taxas evolutivas através dos sítios em uma matriz de estimativa e utiliza um banco de dados grande e diverso; +I (Reeves, 1992) que adiciona a informação que uma fração de aminoácidos é invariável; e +G (Yang, 1993) que adiciona a informação de que existem categorias diferentes de frequência de substituição de aminoácidos (baixa, média e

alta), e determina a probabilidade de cada sítio pertencer a cada uma dessas categorias. O RAxML (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) (Stamatakis, 2014), programa para inferência baseada em máxima verossimilhança sequencial e paralela, foi utilizado para construir árvores filogenéticas a partir de 10 árvores iniciais de máxima parcimônia randomizadas. Em seguida, selecionou-se a melhor árvore e a confiabilidade estatística da árvore filogenética foi calculada por meio de análises de *bootstrap* com 100 repetições e aplicada à árvore de máxima verossimilhança (*likelihood*). A análise Bayesiana foi realizada utilizando o MrBayes (v3.2.6) (Huelsenbeck; Ronquist, 2001) que utiliza métodos de Monte Carlo da cadeia de Markov (MCMC) (Larget; Simon, 1999) para estimar a distribuição posterior dos parâmetros do modelo. Foi realizado um total de 100.000 gerações, amostrando a cada 100 gerações. Finalmente, as árvores foram desenhadas utilizando o software FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2009). As topologias das árvores de ambos os métodos filogenéticos (ML e Bayesiana) foram comparadas e utilizadas para classificar as sequências de ASNases.

3.16.3 Análises das sequências e clados

Para cada classe, foi realizada uma busca sobre a localização celular, informações funcionais e estruturais no UNIPROT para cada sequência. Para a análise das estruturas cristalográficas disponíveis, as coordenadas foram obtidas junto ao *Protein Data Bank* (Berman, 2000) e as figuras foram geradas utilizando o software Pymol (<http://www.pymol.org>) e o Discovery Studio 4.0 (Dassault Systèmes BIOVIA). O programa *Motif-based sequence analysis tools* 5.0.2. (MEME) (<http://meme-suite.org/tools/meme>) foi utilizado para identificar os motivos presentes nos grupos das sequências. A construção de modelos teóricos foi efetuada utilizando o programa Modeller (Emsley; Cowtan, 2004) para Asp1 ou SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org>) para ASNase de *Rhizobium etli*. Após uma compilação dos dados obtidos, a divisão de classes em grupos de enzimas pertencentes a cada classe foi realizada através da relação entre estrutura primária e terciária, características funcionais e em valores de *bootstrap* e de probabilidades posteriores.

4 Resultados e Discussão

4.1. Caracterização estrutural e funcional da enzima recombinante Asp1 de *S. cerevisiae*

4.1.1. Análises estruturais e funcionais

Quando a sequência proteica da Asp1 de levedura é alinhada com as isoformas bacterianas de *E. coli* e *E. chrysanthemi*, são detectadas semelhanças significativas (~ 38% de identidade e ~ 54 % de similaridade) (Figura 4), incluindo os aminoácidos envolvidos na atividade sobre asparagina das ASNases, estritamente conservados na enzima de *S. cerevisiae*. Adicionalmente, a sequência primária da enzima de levedura revela a presença de resíduos de cisteínas (dez), uma característica bastante importante, pois a formação de um dissulfeto na ASNase de *E. coli* está relacionado com a estabilidade da enzima (Papageorgiou *et al.*, 2008). Neste sentido, as cisteínas em Asp1 de levedura podem resultar na formação de dissulfetos, o que pode conferir maior estabilidade a enzima.

Em razão da alta identidade com as enzimas bacterianas, foi possível a criação de um modelo teórico preliminar da Asp1 de *S. cerevisiae*, utilizando o programa Modeller (Emsley; Cowtan, 2004), para uma avaliação prévia da estrutura teórica (Figura 5A), o que permitiu observar que os aminoácidos Thr64, Tyr78, Thr141, Asp142, Lys111 e Lys215 de Asp1 (Figura 5B) apresentam localização espacial semelhante aos aminoácidos envolvidos na catálise em *E. coli* (Thr12, Tyr25, Thr89, Asp90, Lys162 e Glu283) (Figura 5C) e *E. chrysanthemi* (Thr15, Tyr29, Glu63, Thr95, Asp96 e Lys168) (Figura 5D), no entanto, com maior semelhança com a ASNase de *E. chrysanthemi*, uma vez que todos os resíduos do sítio ativo se encontram no mesmo monômero, ao contrário da ASNase de *E. coli*, que possui o resíduo Glu283 oriundo do monômero adjacente (Figura 5C e D).

Utilizando o modelo teórico de Asp1, localizamos as posições das cisteínas na estrutura, e podemos observar que algumas (98-187 e 251-361), levando em conta o modelo, estão em grande proximidade (5 - 7 Å) e podem formar pontes dissulfetos intramoleculares (Figura 5E). É importante salientar que 3 das 10 cisteínas se encontram na região N-terminal da proteína, a qual é inexistente no modelo. Adicionalmente, a presença de cisteínas na superfície do modelo ainda torna possível a modificação da enzima com PEG em função do tiolato livre ou mesmo de dissulfetos, a qual é capaz de garantir uma modificação estequiometricamente mais eficiente, específica e homogênea, contribuindo para uma maior

estabilidade e diminuindo os efeitos imunogênicos da enzima, além de promover a oclusão de sítios sujeitos a ataques proteolíticos (Balan *et al.*, 2007; Rosendahl *et al.*, 2005).

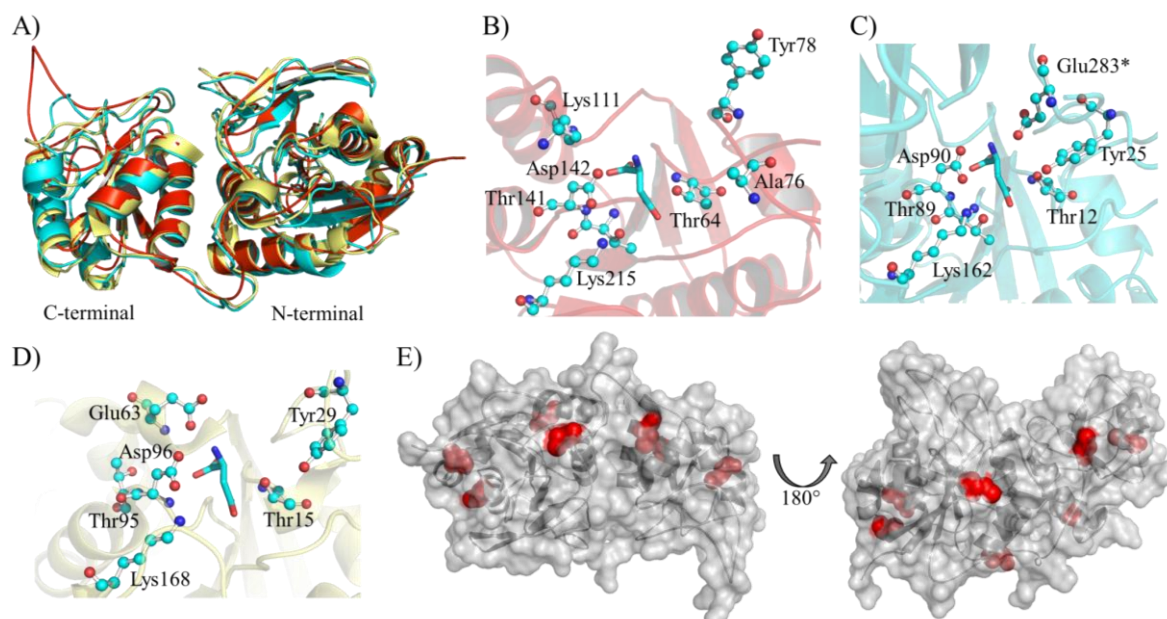


Figura 5. Comparação de estruturas de ASNases bacterianas e o modelo teórico de Asp1 de levedura. **A)** Modelo teórico de Asp1 de levedura (vermelho) em sobreposição com ASNases bacterianas, Eca2 (ciano) e Era2 (amarela). **B)** Detalhe do sítio ativo do modelo teórico de Asp1, com os aminoácidos representados em *balls and sticks* e colorizado em CPK (N = azul O = vermelho). **C)** Sítio ativo da ASNase 2 de *E. coli* (Eca2), com os aminoácidos representados em *balls and sticks* e colorizado em CPK (N = azul e O = vermelho). O resíduo Glu 283 é oriundo do monômero adjacente. **D)** Ambiente do sítio ativo da ASNase 2 de *E. chrysanthemi* (Era2), com os aminoácidos representados em *balls and sticks* e colorizado em CPK (N = azul e O = vermelho). **E)** Superfície molecular do modelo teórico de Asp1 representado em cinza e as cisteínas em vermelho.

Uma vez que aparentemente as cisteínas podem exercer um papel importante no enovelamento da enzima, inicialmente optamos por expressar a enzima utilizando a linhagem *E. coli* Origami BL21 (DE3), que favorece a formação de dissulfetos em razão de possuir deleções da tiorredoxina redutase (*trxB*) e glutathiona redutase (*gor*) e utilizamos o plasmídeo *pET15b-asp1* (Figura 6A). Para a caracterização foram efetuados experimentos de SEC visando investigar o grau oligomérico da enzima. Inicialmente 20 μ l (50 μ M) da enzima foi aplicada na coluna cromatográfica, de acordo com a seção de materiais e métodos, e foi possível observar três picos que apresentaram tempos de retenção aproximados de ~ 7 e 9 min, o que correspondem a estruturas de alto peso molecular (maiores que 158 kDa e com aproximadamente 158 kDa, respectivamente), e ~ 10 min, com tempo de retenção correspondente à 44 kDa, revelando a presença de monômeros da enzima (Figura 6B), dados que contrastam com os descritos para ASNases de bactérias, que são predominantemente tetraméricas (Lubkowski *et al.*, 1996; Papageorgiou *et al.*, 2008; Sanches *et al.*, 2003b). Adicionalmente, a expressão utilizando outras linhagens de *E. coli* (ex. BL21 (DE3)) resultou em espécies de alto peso molecular com tempo de retenção ainda maiores (~ 670 kDa) (Figura

6C). Neste contexto, a presença de espécies de alto peso molecular representa desvantagens terapêuticas, pois podem reduzir a acessibilidade em tumores sólidos e apresentar alto teor imunogênico (McCredie *et al.*, 1953). Adicionalmente, como a cauda de histidina adicionada pelo vetor de expressão na enzima pode ser imunogênica, utilizamos o kit *Thrombin Clean Cleave* (Sigma) seguindo as orientações do fabricante para efetuar a clivagem. No entanto, após a clivagem, quando a enzima foi submetida à SEC, foi detectado apenas o pico referente ao tempo de retenção de ~ 10 min, que corresponde à massa molecular de ~ 44kDa, representando a massa aproximada do monômero (Figura 6D), sendo assim, denominada de ASNaseM (M = monomérica), sugerindo que a cauda de histidina induz a formação de espécies de alto peso molecular.

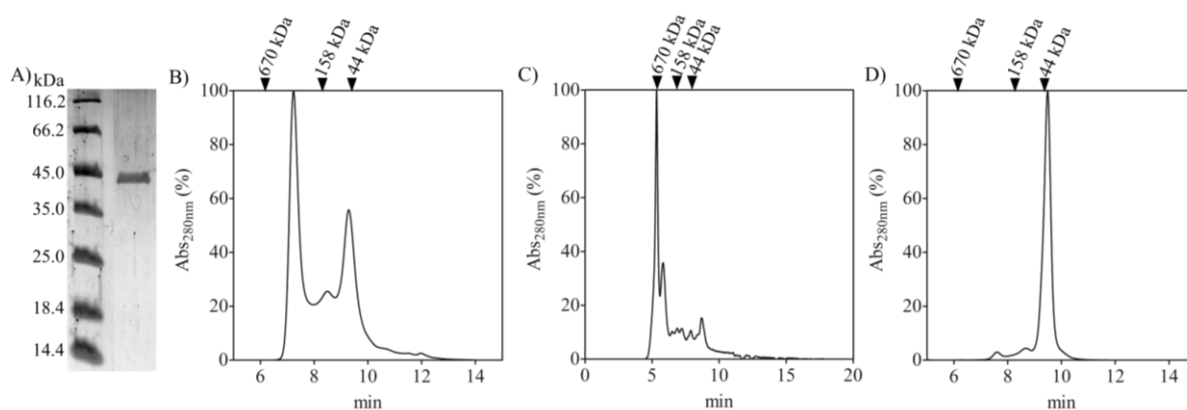


Figura 6: SDS-PAGE de Asp1 purificada e avaliação do estado oligomérico. **A)** Gel de poliacrilamida 12% e corada com *coomassie blue* contendo, na *lane* 1, o marcador de peso molecular *Unstained Protein Marker* (Thermo Scientific) e na *lane* 2, ASNase de levedura purificada por IMAC. **B)** Cromatografia de exclusão molecular de Asp1 de levedura com cauda de histidina e **C)** sem cauda de histidina. As setas representam os padrões de massa molecular utilizado (respectivamente na ordem decrescente - tioglobulina bovina 670.000 Da, γ globulina bovina 158.000 Da, e ovalbumina de galinha 44.000 Da).

Uma vez que o propósito do estudo desta enzima visa aplicações terapêuticas, foram testados outros sistemas de expressão, uma vez que a expressão em Origami produziu baixa quantidade de proteínas recombinantes (1mg para 1L de cultura de células), a utilização de kit comercial para a remoção da cauda de His aumenta consideravelmente os custos e o Ca^{++} utilizado no processo de remoção da cauda aniquila a atividade da enzima (Costa *et al.*, 2016), optamos por utilizar outro sistema de expressão.

Para tanto foi efetuada uma nova construção, com colaboração do Dr. Carlos Breyer e Dr. Francisco Javier Medrano, CIB, Madrid/Espanha, inserindo o gene *asp1* no plasmídeo pET28PP-MBP o qual gera uma proteína fusionada a MBP (*Maltose Binding Protein*) que aumenta a solubilidade da enzima recombinante, adiciona cauda de His que pode ser retirada utilizando a HRV3C protease, enzima que não necessita de cálcio no tampão. A linhagem utilizada foi *E. coli* C43, efetiva na expressão de proteínas tóxicas (Rosano e Ceccarelli,

2014), uma vez que ASNases podem ser tóxicas ao depletar Asn disponível para as células. Adicionalmente, já foi demonstrado que esta linhagem também é capaz expressar eficientemente proteínas contendo dissulfetos estruturais (Ranjit *et al.*, 2011; Toplak *et al.*, 2013; Voet-van-Vormizeele e Groth, 2003).

Mesmo com a alteração de linhagem e plasmídeo, os ensaios envolvendo SEC revelaram que a enzima sem cauda se apresentou como monômero (Figura 7A), o que indica a necessidade da remoção da cauda de histidinas para evitar a formação de agregados. Os resultados apresentados na seção seguinte são referentes a expressão de ASNase de levedura recombinante utilizando o plasmídeo pET28PP-MBP/*asp1* em linhagem BL21 C43 (DE3) após a clivagem da enzima MBP e cauda de histidina (ASNaseM).

Com o objetivo de investigar a presença de dissulfetos em ASNaseM, foi realizado um ensaio de quantificação do teor de grupos sulfidril (SH) da enzima utilizando 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB). Sendo assim, a quantificação de grupos sulfidrilas utilizando o reagente DTNB e 20µM de enzima (cada 20µM de TNB formado para cada grupo sulfidril livre), revelou que há aproximadamente duas cisteínas livres na enzima (52,83 µM de TNB formado com a enzima desnaturada), sendo que apenas uma delas se encontra acessível na estrutura proteica (26,98 µM de TNB formado com a enzima nativa) (Figura 7B). Os resultados sugerem que há a formação de quatro dissulfetos, uma vez que oito resíduos de cisteínas não reagiram com DTNB, fator importante para a estabilidade da enzima, e a exposição de um resíduo de Cys torna possível o processo de conjugação seletiva com PEG.

Uma vez que a quantificação de sulfidrilas livres sugere que ASNaseM apresenta 4 dissulfetos em sua estrutura, o que pode conferir à enzima maior estabilidade, através de espectroscopia de dicroísmo circular (CD), determinamos a temperatura de *melting* (T_m) da enzima, visando investigar o quão estável é a enzima frente a altas temperaturas. Primeiramente, para acompanhar o desenovelamento de α -hélices, tipo de estrutura secundária mais suscetível a ter suas interações químicas rompidas com o aumento da temperatura (Kelly *et al.*, 2005), o comprimento de onda foi fixado a 222nm (θ_{222}), e o incremento de temperatura foi de 2°C/min, iniciado a 20°C, e registrado até atingir 90°C. Utilizando o *software GraphPad Prism*, foi possível calcular o $T_m = 54,35 \pm 0,37$ °C (Figura 7C), utilizando a equação de Boltzmann, apresentando $R^2 > 0,98$. Adicionalmente, através do ensaio colorimétrico com o reagente de Nessler, a temperatura ótima da enzima ASNaseM foi calculada, utilizando diferentes temperaturas, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C, por 20 minutos de reação para cada temperatura. A $40,5 \pm 0,7$ °C, a enzima apresentou atividade

relativa de 100%, enquanto que em temperatura fisiológica ($\sim 37^\circ\text{C}$), a atividade foi de aproximadamente 80% (Figura 7D). Os dados de temperatura ótima são consistentes com os experimentos de CD, uma vez que à 55°C , foi possível observar aproximadamente 50% da atividade relativa. Adicionalmente, utilizando a mesma abordagem, foi possível investigar o efeito do pH na atividade da enzima, mensurada nos pHs 4,0 a 12,0 (com intervalos de 0,5). A enzima ASNaseM apresentou atividade entre os pHs 6,0 e 10,5, no entanto, sua atividade ótima foi observada em $\text{pH } 8,4 \pm 0,06$ (Figura 7E) e em pH fisiológico, a atividade relativa da enzima foi de aproximadamente 90%.

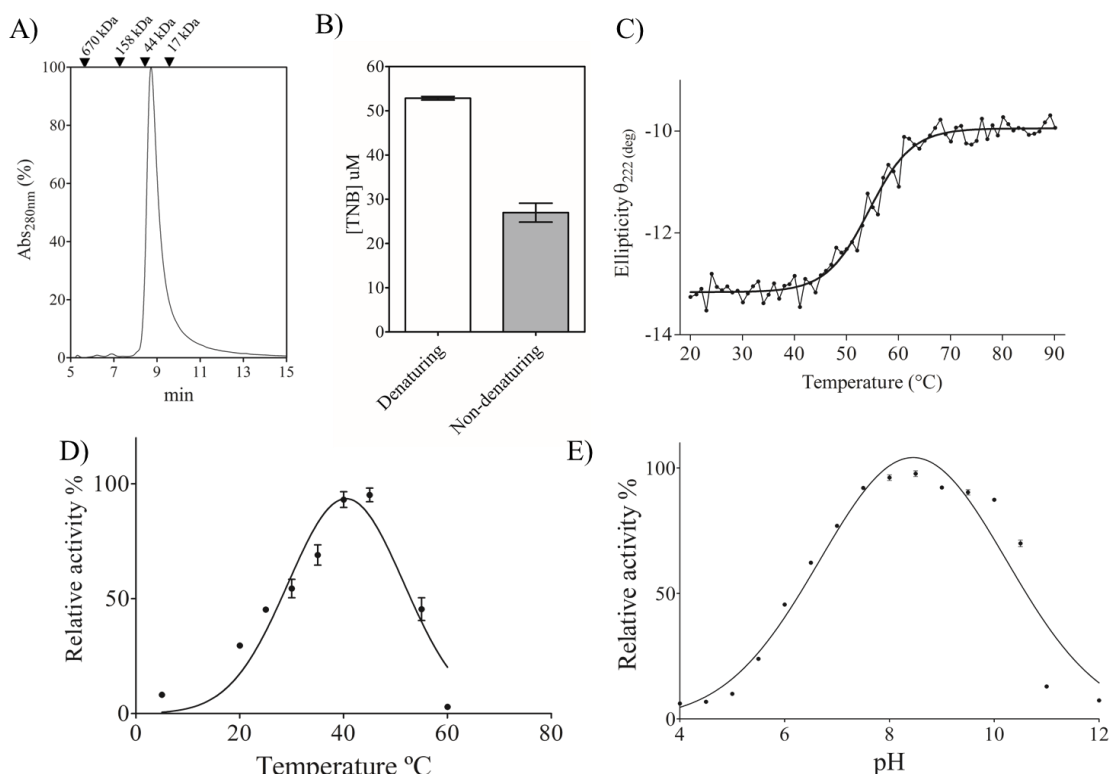


Figura 7: Análises estruturais, T_m e temperatura e pH ótimos. **A)** Cromatografia de exclusão molecular de amostras de ASNaseM. Os padrões de massa molecular utilizados nos experimentos de SEC foram Tioglobulina bovina (670.000 kDa), γ globulina bovina (158.000 kDa) e Ovalbumina de galinha (44.000 kDa), e estão indicados por setas na parte superior da figura. **B)** Ensaio de quantificação de grupos sulfidrilas livres utilizando DTNB, utilizando 500 μM de DTNB, em tampão desnaturante contendo ureia e não desnaturante. **C)** O perfil de *Thermal melting* de ASNaseM foi registrado a 222 nm e a temperatura foi de 20 a 90°C a 2°C min^{-1} . A concentração de proteína utilizada foi de 5 μM em tampão Tris 10 mM (pH 7,4). O valor de T_m obtido foi de $54,35 \pm 0,37^\circ\text{C}$. **D)** A temperatura ótima foi obtida através da atividade relativa determinada de $5\text{--}60^\circ\text{C}$, utilizando o reagente de Nessler, e Asn como substrato. **E)** O pH ótimo foi obtido através da atividade relativa determinada de 4-12, utilizando o reagente de Nessler, e Asn como substrato. Os procedimentos experimentais foram realizados em triplicata ao menos três vezes.

Sabe-se que as enzimas bacterianas comerciais são homotetraméricas, com monômeros contendo 326 aminoácidos. ($\sim 34,6$ kDa) dispostos em dois domínios α/β globulares (N-terminal e C-terminal) e quando a enzima heteróloga Asp1 de levedura, após a clivagem da cauda de histidina e da proteína de fusão MBP, foi submetida a cromatografia de exclusão molecular para analisar o estado oligomérico, o tempo de retenção determinado foi

equivalente ao monômero (~44 kDa) (Figure 7A), o que está em acordo com a enzima obtida pelo sistema utilizado inicialmente. Cabe ressaltar que esta característica não é observada em nenhuma outra asparaginase caracterizada, a qual pode apresentar menor imunogenicidade e ser utilizada em outros tipos de câncer, além dos linfomas. Neste sentido, a enzima de baixo peso molecular obtida (~44 kDa), a qual denominamos de ASNaseM (asparaginase monomérica), pode representar uma alternativa terapêutica para o tratamento de tumores (Pedido de Patente: BR 10 2016 024702-0 A2 – Apêndice B).

Para avaliar a atividade de asparaginase de ASNaseM, o ensaio espectrofotométrico acoplado a glutamato desidrogenase (GDH) foi realizado a 37°C utilizando Asn como substrato. Diferentes concentrações dos substratos foram utilizadas e os resultados de velocidade inicial em função da concentração de substratos foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism, determinados através de regressão linear. Os resultados revelaram que a enzima apresentou comportamento alostérico, com cooperatividade positiva, indicada pelo coeficiente de Hill = 2,125, e apresentou $k_{cat} = 3,844 \text{ s}^{-1}$ e $S_{0.5} = 0,355 \text{ mM}$ (Figura 8A). Adicionalmente, a enzima apresentou eficiência catalítica de $1,4 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabela 1). No entanto, quando comparada com ASNase1 na presença de cauda de histidina, é possível observar uma diminuição da afinidade por Asn, uma vez que para ASNase1 de *S. cerevisiae*, o valor de $S_{0.5} = 0,075 \text{ mM}$ (Costa *et al.*, 2016). Ainda, os resultados revelam que a eficiência catalítica de ASNaseM é menor, quando comparada à enzima de *Erwinia chrysanthemi* ($4,37 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Nguyen *et al.*, 2016), no entanto, próxima à determinada para a ASNase de *Helicobacter pylori* ($6,6 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Maggi *et al.*, 2015), para ambas as enzimas, os parâmetros cinéticos foram determinados utilizando o ensaio espectrofotométrico acoplado à GDH. Adicionalmente, utilizando o ensaio colorimétrico com o reagente de Nessler, foi possível obter ASNaseM com atividade específica (107,9 UI / mg enzima) (Figura 8B) (Tabela 1), muito próxima a atividade específica das enzimas comerciais (85 - 225 UI / mg enzima).

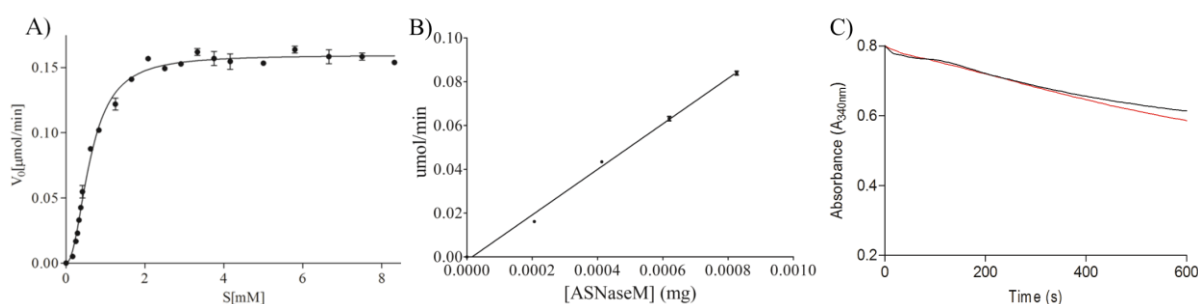


Figura 8: Avaliação da atividade de asparaginase e glutaminase de ASNaseM. A) As reações continham 50 mM de tampão Tris, pH 7,4, α -cetoglutarato 1 mM, NADH 0,24 mM, 1 U de GDH e 0 - 8,5 mM de Asn e 50 nM de ASNaseM, em volume final foi de 370 μ l. As reações foram iniciadas através da adição do substrato, e o consumo de NADH foi monitorado a 340 nm em leitor de microplacas SpectraMax 340PC384 (Molecular

Devices). **B)** Representação gráfica dos resultados do ensaio de atividade específica sobre Asn de ASNaseM, com concentrações de enzima variadas (0 – 0,001 mg/ml de enzima), e 40 mM de Asn, realizada a temperatura de 37°C, por 20 min, posteriormente, as medidas espectrofotométricas (440 nm) foram registradas após a reação ser paralisada com TCA (1,5M) e adicionado o reagente de Nessler, para quantificação de NH₃. Foi possível observar atividade específica de 107,9 IU/ mg proteína. **C)** As reações continham 50 mM de tampão Tris, pH 7,4, α-cetoglutarato 1 mM, NADH 0,24 mM, 2 U de GDH e 100 mM de Gln e 100 nM de ASNaseM, em volume final de 370 µl. A reação foi iniciada através da adição do substrato, e o consumo de NADH foi monitorado a 340 nm utilizando um leitor espectrofotométrico de microplacas SpectraMax 340PC384 (Molecular Devices). As reações com ASNaseM estão representadas pela linha vermelha, e os controles pela linha preta. Todos os procedimentos foram efetuados ao menos três vezes em triplicata.

Table 1 Kinetic parameters to L-Asn

Kinetic Parameters	
n_H	2.125 ± 0.092
$V_{max} (\mu M \cdot min^{-1})$	0.1594 ± 0.0014
$k_{cat} (s^{-1})$	3.844 ± 0.1205
$S_{0.5} (mM)$	0.355 ± 0.029
$k_{cat}/S_{0.5}^{n_H} (M^{-1} \cdot s^{-1})$	1.4×10^1
Specific activity (IU/mg)	107.9 ± 2.57

Visando analisar os parâmetros cinéticos de ASNaseM sobre Gln, também foram realizados ensaios espectrofotométricos acoplados a GDH a 37°C utilizando Gln como substrato. Diferentes concentrações dos substratos foram utilizadas, com a concentração máxima de substrato maior, 100 mM de Gln e também com concentração maior de GDH, 2 U, visando a detecção da possível atividade de glutaminase, mesmo que residual. No entanto, a enzima ASNaseM não apresentou atividade sobre o aminoácido Gln (Figura 8C), o que está em acordo com a enzima recombinante caracterizada anteriormente com cauda de histidinas (Costa *et al.*, 2016). Sabe-se que o aminoácido glutamina representa até 50% dos resíduos presentes no soro e sua diminuição pode reduzir a síntese proteica e causar diversos efeitos colaterais (Girão *et al.*, 2016; Ollenschlager *et al.*, 1988; Ramya *et al.*, 2012). Contudo, uma enzima sem atividade de glutaminase pode produzir efeitos satisfatórios em casos de LLA em que as células não produzem ASN sintetase (ASNS⁻), diminuindo os efeitos colaterais do tratamento. Por outro lado, alguns autores ressaltam que atividade de glutaminase é importante para citotoxicidade, principalmente em células tumorais onde o gene da asparagina sintetase (ASNS) permanece ativo mesmo após a transformação neoplásica (tipos tumorais ASNS⁺) (Chan *et al.*, 2014; Offman *et al.*, 2011). Portanto, uma abordagem importante consiste na substituição de resíduos envolvidos na atividade de glutaminase, presentes nas enzimas bacterianas, ausentes na enzima ASNaseM, visando investigar a importância destes

resíduos. Neste contexto durante o desenvolvimento do trabalho, realizamos mutações sítio-dirigidas com o intuito de investigar se os resíduos envolvidos na catálise exercem papel semelhante ao descrito para enzimas bacterianas e também se poderiam interferir nos parâmetros cinéticos de ASNaseM.

4.1.2 Mutações sítio dirigidas para avaliar resíduos envolvidos com atividade GLNase

Como discutido nos tópicos anteriores, existem resíduos cuja a importância na catálise e tanto na atividade primária de ASNase quanto na secundária de GLNase das asparaginases bacterianas já foram determinadas. De fato, a atividade da enzima reside na coordenação de passos enzimáticos utilizando duas tríades catalíticas, ambas contendo resíduos de Thr (Figura 3) (Tríade 1: Thr12-Tyr25-Glu283 e Tríade 2: Thr89-Asp90-Lys162 em *E. coli* e Tríade 1: Thr15-Tyr29-Glu63 e Tríade 2: Thr95-Asp96-Lys168 em *E. chrysanthemi*). Uma vez que o aminoácido Gln é mais volumoso que Asn, a redução do volume de aminoácidos da tríade catalítica, como a substituição de Thr por Ser, poderia auxiliar na acomodação do substrato Gln ou mesmo aumentar a afinidade por Asn. De fato, Chan e colaboradores (2014) demonstraram que a substituição de um resíduo de glutamina (Gln59) da ASNase de *E. coli*, encontrada na cavidade do sítio ativo, por um resíduo de Leu é capaz de reduzir drasticamente a atividade de GLNase. Adicionalmente, Mehta e colaboradores (2014) demonstraram que a substituição do resíduo Tyr76 por uma Phe resulta em uma enzima com atividade de ASNase inalterada, mas atividade de GLNase indetectável. Em ambos os casos a redução do volume do sítio ativo foi considerado um dos fatores importantes para os fenômenos observados. Em ASNaseM estes resíduos são naturalmente substituídos por um resíduo de lisina (111) e outro de glutamina (228) o que pode estar envolvido na ausência da atividade de GLNase. Portanto, uma abordagem importante consiste na substituição dos resíduos de Lys111 e Gln228 por Gln e Tyr, respectivamente, visando investigar o papel destes resíduos na atividade de glutaminase. Para tanto, foram realizadas as mutações sítio dirigidas do gene substituindo o resíduo de lisina 111 por glutamina (ASNaseM^{K111Q}) e outra substituição do resíduo de glutamina 228 por tirosina (ASNaseM^{Q228Y}).

Para analisar se a substituição de glutamina por tirosina na posição 228 resultou em alterações na atividade da enzima, avaliamos a atividade de ASNaseM^{Q228Y} sobre Asn e Gln, através do ensaio espectrofotométrico acoplado utilizando GDH. A reação foi realizada como descrito na seção de materiais e métodos, no entanto, as concentrações de substratos (0 – 100 mM) diferem das utilizadas para a enzima do tipo selvagem, uma vez que a substituição do

aminoácido glutamina 228 por um resíduo de tirosina acarretou no aumento do $S_{0.5}$ da enzima (0,335 mM para a ASNaseM e 38,05 mM para ASNaseM^{Q228Y}). De fato, foi possível observar a queda de atividade, mesmo na concentração de 100 mM de substrato (Figura 9A). Adicionalmente, a enzima ASNaseM^{Q228Y} apresentou $k_{cat} = 2,019 \text{ s}^{-1}$ e $V_{max} = 0,101 \text{ } \mu\text{mol/min}$, revelando também uma redução drástica quando comparado com ASNaseM (Figura 9B). Para o substrato Gln, a enzima ASNaseM^{Q228Y} também não apresentou atividade sobre Gln (Figura 9C), sugerindo que este aminoácido não altera a atividade secundária de glutaminase, ao contrário do observado em Eca2 (Chan *et al.*, 2014; Mehta *et al.*, 2014).

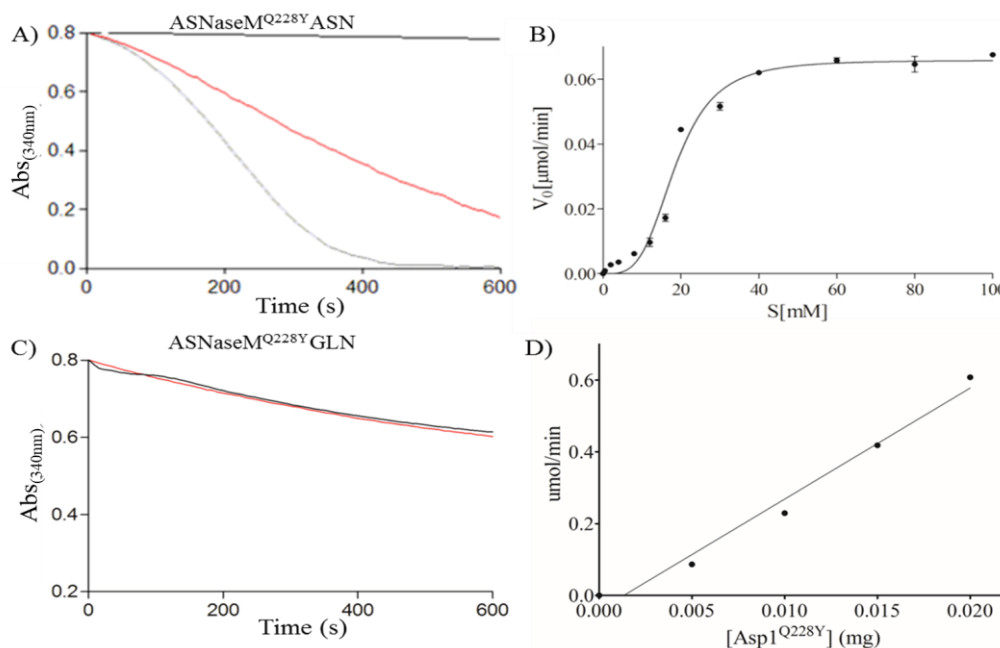


Figura 9: Análises da atividade de asparaginase e glutaminase de ASNaseM^{Q228Y}. **A)** As reações continham 50 mM de tampão Tris, pH 7,4, α -cetoglutarato 1 mM, NADH 0,24 mM, 1 U de GDH e 100 mM de Asn e 50 nM de ASNaseM^{Q228Y}, em volume final de 370 μl . As reações foram iniciadas através da adição do substrato, e o consumo de NADH foi monitorado a 340 nm em leitor de microplacas. As reações com ASNaseM^{Q228Y} estão representadas pela linha vermelha, os controles da reação pela linha preta, a reação com Eca2 em cinza. **B)** Perfil cinético sobre Asn de ASNaseM, apresentando comportamento alostérico. **C)** As reações continham 50 mM de tampão Tris, pH 7,4, α -cetoglutarato 1 mM, NADH 0,24 mM, 1 U de GDH e 100 mM de Gln e 100 mM de ASNaseM^{Q228Y}, em volume final de 370 μl . A reação foi iniciada através da adição do substrato, e o consumo de NADH foi monitorado a 340 nm em leitor de microplacas. A reação com ASNaseM^{Q228Y} está representada em vermelho, o controle da reação em preto. **D)** Representação gráfica do resultado do ensaio de atividade específica sobre Asn de ASNaseM^{Q228Y}, com concentrações de enzima variadas (0 – 0,02 mg/ml de enzima), e 40 mM de Asn, realizada a temperatura de 37°C, por 20 min, posteriormente, medidas espectrofotometricamente a 440 nm após a reação ser paralisada com TCA (1,5M) e adicionado o reagente de Nessler, para quantificação de NH_3 . Foi possível observar atividade específica de 30,95 IU/ mg proteína. Todos os experimentos foram realizados três vezes em triplicata.

Adicionalmente, foi avaliada a atividade específica de ASNaseM^{Q228Y} sobre Asn utilizando o ensaio colorimétrico com o reagente de Nessler. Corroborando com os resultados obtidos através dos ensaios espectrofotométricos acoplado a GDH, foi possível observar que a enzima ASNaseM^{Q228Y} possui atividade específica de 30,95 UI / mg enzima (Figura 9D), aproximadamente 3 $\times$ menor em relação a atividade específica observada para ASNaseM.

De acordo com o nosso modelo teórico, a glutamina 228 está localizada no final de um *loop* (209-SGY $\underline{\text{Y}}$ IT $\underline{\text{K}}$ TNANSLDSFNVRQGYL-231) no qual se encontra o resíduo de lisina 215, que faz parte do sítio catalítico (Figura 10A) (Costa *et al.*, 2016) e um resíduo de tirosina 212 no início deste *loop* (Figura 10A). Adicionalmente, estes resíduos realizam uma ligação de hidrogênio não convencional, do tipo NH- π (Nishio *et al.*, 2014; Steiner; Koellner, 2001), onde o grupo amina da glutamina é o doador de um átomo de hidrogênio, enquanto que o anel aromático da tirosina é o acceptor (Figura 10B), o que sugere ser uma ligação importante para o posicionamento correto do *loop*, do qual o aminoácido K215 está localizado. Desta forma, uma possibilidade é que a substituição de Gln228 por Tyr impossibilita esta ligação (Figura 10C), deixando o *loop* mais flexível, resultando em menor atividade de asparaginase.

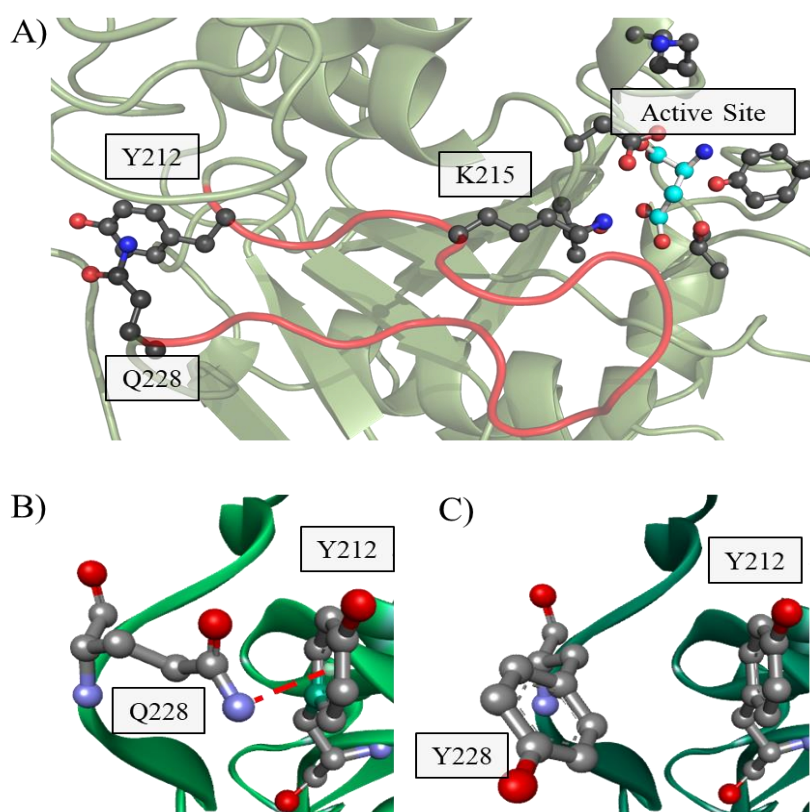


Figura 10: Representação de estruturas de ASNaseM contendo Gln ou Tyr na posição 228. A) Modelo teórico de ASNaseM representado por *cartoon*, colorizado em verde, e a região do *loop* onde é encontrado o aminoácido Lys 215 em vermelho, e a região do sítio ativo com os aminoácidos das tríades, o aminoácido Gln 288, o aminoácido Tyr 212 e o ligante Asp, todos representados em *balls and sticks*. Os átomos estão colorizados seguindo o padrão CPK: O = vermelho, N = azul. B) Modelo teórico representando a interação do tipo NH- π , onde o grupo amina da glutamina é o doador de um átomo de hidrogênio, enquanto que o anel aromático da tirosina é o receptor, sugerindo uma ligação importante para o posicionamento correto do *loop*, do qual aminoácido K215 está localizado. C) Modelo teórico representando a substituição de Gln228 por Tyr, onde não ocorre a interação do tipo NH- π , deixando o *loop* flexível. Os modelos estão representados em *cartoon*, colorizado em verde claro para ASNaseM^{WT} e verde escuro para ASNaseM^{Q228Y}, e os aminoácidos estão representados em *balls and sticks*, colorizados seguindo o padrão CPK: O = vermelho, N = azul. As figuras foram geradas utilizando o programa Discovery Studio (<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>).

A substituição de lisina por glutamina na posição 111 resultou em alterações na atividade da enzima, através do ensaio espectrofotométrico acoplado a GDH sobre Asn e Gln. Para o substrato Asn, foi possível observar uma redução drástica da atividade, mesmo utilizando uma alta concentração de substrato (100mM) e o dobro de enzima (100nM) (Figura 11A). A Atividade de asparaginase também foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico com o reagente de Nessler, a 37°C (Figura 11B). A reação foi realizada como descrito na seção de materiais e métodos. No entanto, a substituição de lisina por glutamina na posição 111 praticamente aniquilou a atividade de asparaginase da enzima, resultando em uma atividade específica de apenas 0,3 UI/mg de enzima, impossibilitando a determinação dos parâmetros cinéticos sobre Asn. Quanto ao substrato Gln, também utilizando uma concentração máxima de substrato de 100 mM de Gln (Figura 11), entretanto não foi possível observar atividade de glutaminase, sugerindo que este aminoácido também não confere a atividade secundária de glutaminase, ao contrário do observado em Eca2 (Chan *et al.*, 2014; Mehta *et al.*, 2014).

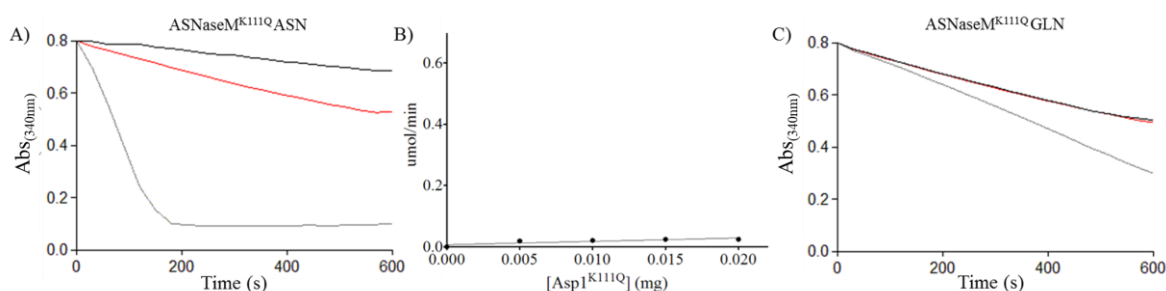


Figura 11: Caracterização de ASNaseM^{K111Q}. **A)** As reações continham 50 mM de tampão Tris, pH 7,4, α -cetoglutarato 1 mM, NADH 0,24 mM, 1 U de GDH e 100 mM de Asn e 100 nM de ASNaseM^{K111Q} ou Eca2, em volume final de 370 μ l. As reações foram iniciadas através da adição do substrato, e o consumo de NADH foi monitorado a 340 nm. A reação com ASNaseM^{K111Q} está representada pela linha vermelha, o controle da reação em preto e a reação com Eca2 em cinza **B)** Representação gráfica do resultado do ensaio de atividade específica sobre Asn de ASNaseM^{K111Q}, com concentrações de enzima variadas (0 – 0,02 mg/ml de enzima), e 40 mM de Asn, realizada a temperatura de 37°C, por 10 min, posteriormente, medidas espectrofotometricamente a 440 nm após as reações serem paralisadas com TCA (1,5M) e adicionado o reagente de Nessler, para quantificação de NH₄. Foi possível observar atividade específica de 0,3 UI/ mg proteína. **C)** As reações continham 50 mM de tampão Tris, pH 7,4, α -cetoglutarato 1 mM, NADH 0,24 mM, 2 U de GDH e 100 mM de Gln e 100 nM de ASNaseM^{K111Q} ou Eca2, em volume final de 370 μ l. As reações foram iniciadas através da adição do substrato, e o consumo de NADH foi monitorado a 340 nm em leitor de microplacas. A reação com ASNaseM^{K111Q} está representada pela linha vermelha, o controle da reação pela linha preta e a reação com Eca2 em cinza.

De acordo com o nosso modelo teórico, o resíduo de lisina 111 está localizada na região do sítio ativo, ocupando a mesma localização espacial do resíduo Glu63 da ASNase2 de *E. chrysantemi* (ErA), sugerindo que este resíduo pode estar envolvido na catálise do substrato. Ainda, de acordo o modelo teórico, o resíduo Lys111 realiza duas pontes de hidrogênio com o resíduo Asp142 (entre o N da cadeia lateral de Lys e o CD da cadeia lateral de Asp e entre o CE de Lys e o OD de Asp). Adicionalmente, Asp142 realiza uma ponte de

hidrogênio com o resíduo de Lys215, que faz parte dos resíduos do sítio catalítico (Costa *et al.* 2016), e duas pontes de hidrogênio com o substrato (Asp) estabilizando-o, sugerindo que a formação desta rede de interações é importante para a estabilização e hidrólise do substrato (Figura 12A). Adicionalmente, quando realizamos a substituição do resíduo de Lys111 por um resíduo de Gln, a cadeia lateral possui um carbono a menos e um oxigênio a mais (Figura 12B). Contudo, nossos resultados sugerem que esta ponte de hidrogênio perdida pode ser determinante para a estabilização dos resíduos do sítio ativo, uma vez que não foi possível observar atividade de asparaginase na sua ausência.

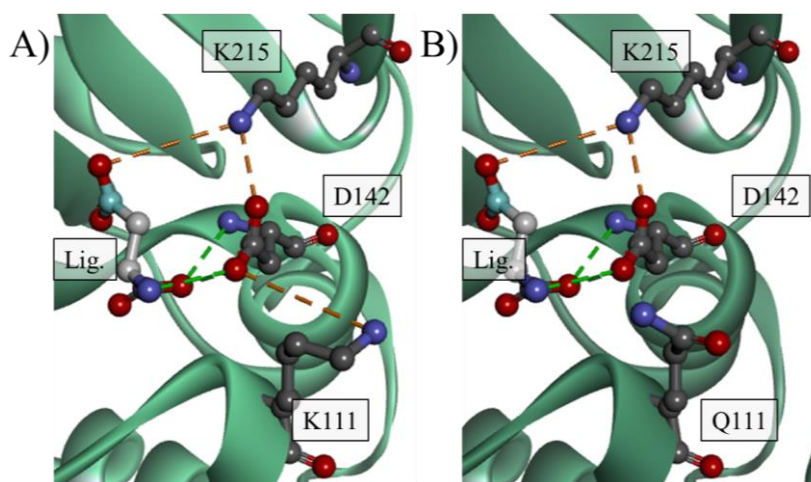


Figura 12: Representação de estruturas de ASNaseM contendo Lys ou Gln na posição 111. A) Modelo teórico de ASNaseM representado em *cartoon*, e a região do sítio ativo com os aminoácidos Lys111, Asp142 e Lys215 e o ligante Asp, todos representados em *balls and sticks*. Os átomos estão colorizados seguindo o padrão CPK: O = vermelho, N = azul. **B)** Modelo teórico de ASNaseM^{K111Q} representado em *cartoon*, e a região do sítio ativo com os aminoácidos Gln111, Asp142 e Lys215 e o ligante Asp, todos representados em *balls and sticks*. Os átomos estão colorizados seguindo o padrão CPK: O = vermelho, N = azul. As figuras foram geradas utilizando o programa Discovery Studio (<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>).

Como mencionado acima, resíduos de Thr compõe ambas as tríades catalíticas de ASNases. Em Peroxirredoxinas (Prx), um grupo de peroxidases capazes de decompor peróxidos como H₂O₂ e peróxidos orgânicos, e possuem em sua tríade catalítica um resíduo de Thr, e em um pequeno número de casos, Ser. Curiosamente, as enzimas selvagens que possuem o resíduo Thr possuem menor afinidade por peróxidos orgânicos, enquanto que aquelas que possuem Ser, há um aumento da eficiência na decomposição de peróxidos orgânicos os quais são mais volumosos, sugerindo razões estéricas (Flohé *et al.*, 2002; Tairum *et al.*, 2012). Em EcA2 já foi demonstrado que a substituição da Thr12 por uma Ser afeta o *K_m* sobre Asn (Derst; Henseling; Röhm, 1992). Sendo assim, a substituição dos resíduos de treonina de ASNases (Thr64 e Thr141 em ASNaseM de *S. cerevisiae*), poderia levar ao aumento do volume do sítio ativo e não só alterar parâmetros cinéticos, mas também conferir

atividade de GLNase em razão do aumento do volume do sítio ativo. Para se avaliar estas possibilidades, foram realizadas as mutações sítio dirigidas no plasmídeo pET28PP-MBP contendo o gene *asp1* substituindo os resíduos de treonina 64 ou 141 por serina (ASNaseM^{T64S} e ASNaseM^{T141S}). Esta parte do trabalho foi efetuada em conjunto com a aluna de iniciação científica Livia Cerf Quintero, sob minha co-orientação.

As atividades sobre Asn e Gln foram analisadas através de ensaios espectrofotométricos acoplados à glutamato desidrogenase, a 37°C, utilizando Asn e Gln como substratos. Comparativamente, com a enzima ASNaseM (Figura 13A) que apresentou $k_{cat} \sim 3,80 \text{ s}^{-1}$ e $V_{max} = 0,1594 \text{ } \mu\text{mol/min}$ para o substrato Asn, observamos que para a enzima ASNaseM^{T64S}, foi possível observar uma redução da atividade de ASNase (Figura 13B), apresentando valores de $k_{cat} \sim 0,86 \text{ s}^{-1}$ e $V_{max} = 0,043 \text{ } \mu\text{mol/min}$, enquanto que a enzima ASNaseM^{T141S} apresentou uma redução mais drástica (Figura 13C), com $k_{cat} \sim 0,30 \text{ s}^{-1}$ e $V_{max} = 0,016 \text{ } \mu\text{mol/min}$. Já para o substrato Gln, não foi possível observar atividade de glutaminase para as enzimas que contém a substituição de resíduos de Thr por Ser, na posição 64 ou 141 (Figura 13 D, E e F).

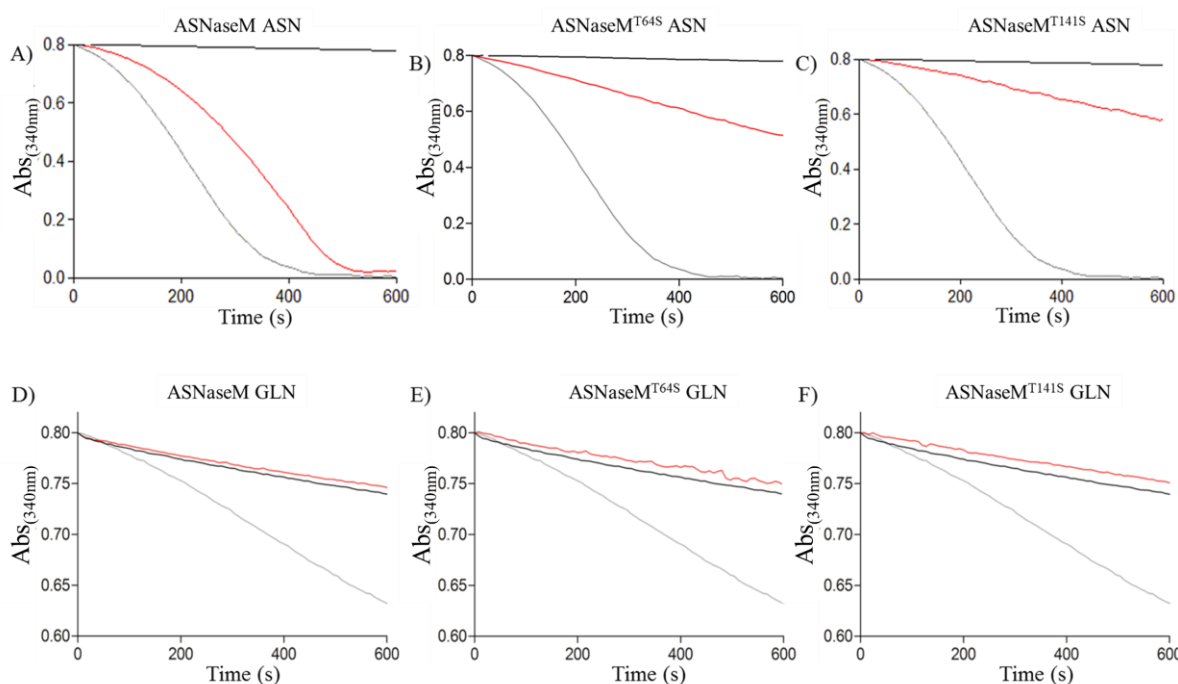


Figura 13: Avaliação da atividade de asparaginase e glutaminase de ASNaseM, ASNaseM^{T64S} e ASNaseM^{T141S}. Comparação do decaimento da absorvância do NADH à 340nm das enzimas ASNaseM (A, atividade ASNase e D, atividade GLNase), ASNaseM^{T64S} (B, atividade ASNase e E, atividade GLNase) e ASNaseM^{T141S} (C, atividade ASNase e F, atividade GLNase) (linhas vermelhas) em comparação com a enzima comercial Kidrolase (EUSA Pharma) (linhas cinzas). Em todos os gráficos as linhas pretas representam o controle negativo da reação (sem adição de enzima). Todos os procedimentos foram realizados à 37°C utilizando Asn ou Gln como substrato, em ensaio espectrofotométrico acoplado a GDH, utilizando concentração de ASNaseM ou proteínas mutantes de 0,925 μM . Os procedimentos experimentais foram efetuados em triplicata ao menos três vezes.

As substituições de Thr por Ser poderiam deixar a cavidade do sítio ativo mais volumosa permitindo uma interação mais acentuada com a Gln, a qual representa um substrato maior que a Asn, o que poderia conferir a atividade de glutaminase para ASNaseM. Entretanto a análise do modelo teórico de ASNaseM contendo Thr e do modelo teórico onde a substituição por Ser foi efetuada *in silico*, revela que as ausências dos grupos CH₃ das Thrs resultaram em um maior volume da cavidade do sítio ativo, como esperado, porém, as análises sugerem que o resíduo de Ser64 poderia ter maior liberdade de movimento, comprometendo o posicionamento produtivo para catálise, enquanto que a ponte salina entre Ser141 e Lys215, também presente no modelo teórico com o resíduo Thr141, poderia ser comprometida com a presença de rotâmeros do resíduo de Ser141, também comprometendo o posicionamento produtivo para a catálise (Figura 14).

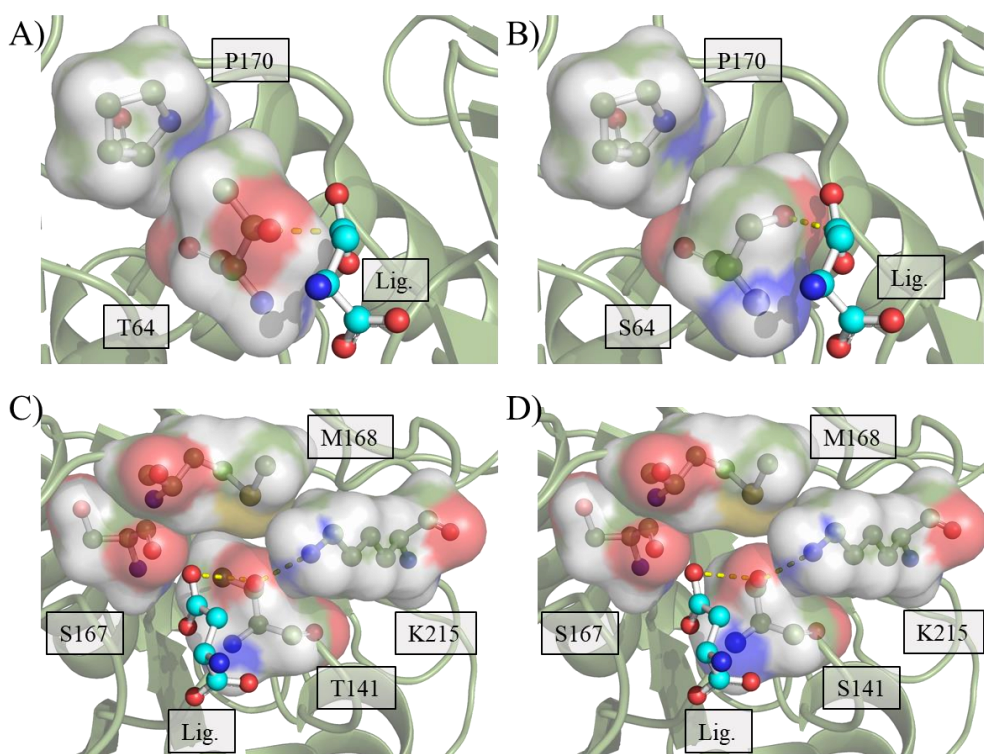


Figura 14: Representação de estruturas de ASNaseM contendo Thr ou Ser nas posições 64 e 141. A) Modelo teórico de ASNaseM representado por *cartoon*, e a região do sítio ativo com os aminoácidos Thr64 e Pro170 representados em *balls and sticks*, e também *surface*, representação que leva em conta o raio atômico, mostrando a região do sítio ativo onde é encontrada a Thr64, e o ligante Asp em *ball and sticks*. **B)** No caso da substituição de Thr64 por Ser, o ambiente do sítio ativo fica menos restrito a movimentos o que pode permitir que Ser apresente rotâmeros variados. **C)** O espaço onde se localiza Thr141 é bastante limitado pela presença de Ser167 e Met168. Por sua vez o O_γ de Thr é estabilizado por uma ponte salina com K215. **D)** No modelo onde Thr foi substituído por Ser, o volume do sítio ativo se torna maior, e o resíduo de Ser também pode ter rotâmeros variados que comprometam o posicionamento correto para a catálise. Os aminoácidos estão representados pelo código de uma letra e colorizados de acordo com o padrão CPK: O = vermelho, N = azul e S = amarelo. As figuras foram geradas utilizando o programa Discovery Studio (<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>).

De modo geral, as mutações sítio dirigidas não foram capazes de conferir atividade de GLNase a enzima, mas alteraram seus parâmetros cinéticos. De fato a substituição de Thr (64 e 141) das tríades catalíticas influenciou de forma muito significativa na atividade da enzima, reduzindo as eficiências catalíticas sobre Asn em aproximadamente $100 \times$, enquanto que a substituição do resíduo de Lys por Gln na posição 111 anulou a atividade de ASNase, e a substituição do resíduo Gln por Tyr na posição 228 reduziu sua eficiência em aproximadamente $1000 \times$ (Tabela 2).

Table 2 Functional and structural characteristics of ASNaseM mutants

Mutant	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Kcat (s^{-1})	ASNase activity	GLNase activity
ASNaseM	0.1594	3.80	Present	Absent
ASNaseM ^{T64S}	0.043	0.86	Reduction - $100 \times$	Absent
ASNaseM ^{K111Q}	N.D.	N.D.	Residual	Absent
ASNaseM ^{T141S}	0.016	0.30	Reduction - $100 \times$	Absent
ASNaseM ^{Q228Y}	0.101	2.019	Reduction - $1000 \times$	Absent

4.1.3 Ensaios de cristalização de Asp1-MBP e ASNaseM

Uma das propostas para a caracterização estrutural da enzima ASNaseM é a determinação da estrutura cristalográfica. Esta etapa do trabalho foi iniciada sob supervisão do Prof. Dr. Paul Long, no King's College, Reino Unido, no entanto, devido a dificuldades técnicas, somente foi possível obter a quantidade de enzima suficiente (10mg/ml) no final do estágio de pesquisa no exterior, então, iniciamos uma parceria com o Prof. Dr. Márcio Vinícius para a continuação dos experimentos. Para isso, foram testadas um total de 480 condições de cristalização para cada enzima, com gotas de $1 \mu\text{l}$ ($0,5 \mu\text{l}$ da solução da proteína + $0,5 \mu\text{l}$ da solução de cristalização), com a concentração de 10 mg/ml. Entretanto, na maioria das condições de cristalização, foi observada a formação de precipitados, cristais de sal ou gotas sem nenhuma alteração (*clear drop*). Em alguns poucos casos foram observados (6) a formação de microcristais (Figura 15), todos utilizando o kit *Crystal Screen* (Hampton Research): A) Asp1-MBP em Acetato de Cálcio 0,2M pH 4,6 e Sulfato de amônia 2 M; B) Asp1-MBP em Tris-HCl 0,1M pH 8,5, 8% PEG8000; C) Asp1-MBP em Cloreto de magnésio 0,2M, HEPES 0,1 M pH 7,5 e 2-Propanol 30%; D) Asp1-MBP em Cloreto de cálcio 0,2M, Acetato de sódio 0,1M pH4,6 e 2-propanol 20%; E) ASNaseM em Cloreto de cálcio 0,2M, Acetato de sódio 0,1M pH4,6 e 2-propanol; e F) ASNaseM em Cloreto de magnésio 0,2M, HEPES 0,1 M pH 7,5.

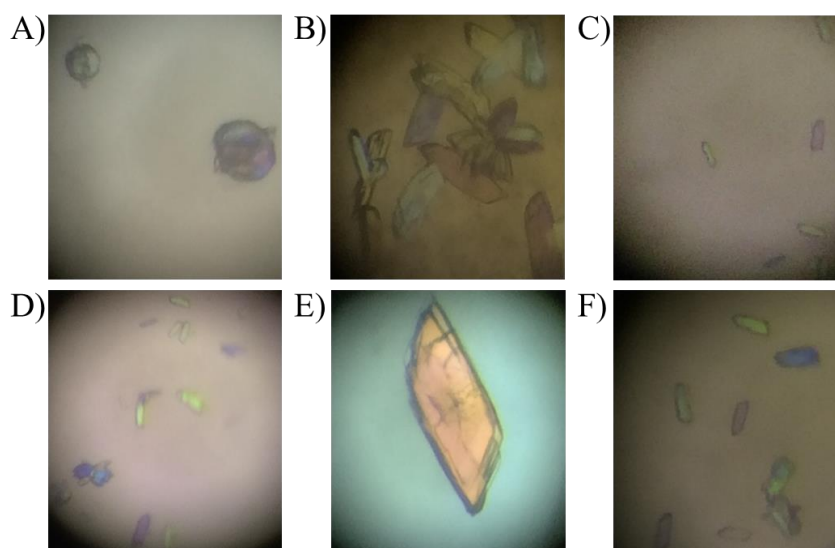


Figura 15: Microcristais de Asp1-MBP e ASNaseM. Foram obtidos através do método de gota sentada (0,5 µl de solução de proteína Tris-HCl 5 mM pH 7,4 + 0,5 µl de solução de cristalização) e enzimas a 10 mg/ml. **A)** Asp1-MBP em Acetato de Cálcio 0,2M pH 4,6 e Sulfato de amônia 2 M; **B)** Asp1-MBP em Tris-HCl 0,1M pH 8,5, 8% PEG8000; **C)** Asp1-MBP em Cloreto de magnésio 0,2M, HEPES 0,1 M pH 7,5 e 2-Propanol 30%; **D)** Asp1-MBP em Cloreto de cálcio 0,2M, Acetato de sódio 0,1M pH4,6 e 2-propanol 20%; **E)** ASNaseM em Cloreto de cálcio 0,2M, Acetato de sódio 0,1M pH4,6 e 2-propanol; **F)** ASNaseM em Cloreto de magnésio 0,2M, HEPES 0,1 M pH 7,5.

De fato, os microcristais obtidos são promissores, sendo necessário a realização de refinamento das condições de cristalização, testando diferentes pHs e concentrações dos componentes de cada solução visando obter cristais passíveis de difração.

4.1.4. Ensaios de citotoxicidade de ASNaseM

O ensaio de redução de MTT foi realizado em colaboração com a Dra. Gisele Monteiro, Ms. Iris Costa, Dra. Sandra Farsky e Dr. Christiano Marcello Vaz Barbosa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. No período de 48 horas, a enzima EcA2 foi capaz de matar 68,7% das células na concentração de 1,0 U/ml para a linhagem leucêmica Molt-4 (Figura 16A), enquanto que a enzima ASNaseM não apresentou atividade citotóxica, mesmos em concentrações altas (10,0 U/ml), atingindo um máximo de 29,3% de atividade citotóxica (5,0 U/ml) (Figura 16B), no entanto, sem diferença significativa com o tratamento com o tampão utilizado. O mesmo pode ser observado para a linhagem leucêmica ReH, onde a enzima comercial EcA2 apresentou atividade máxima com 1,0 U/ml, matando 66,9% das células (Figura 16C), enquanto que a enzima ASNaseM não apresentou atividade citotóxica (Figura 16D).

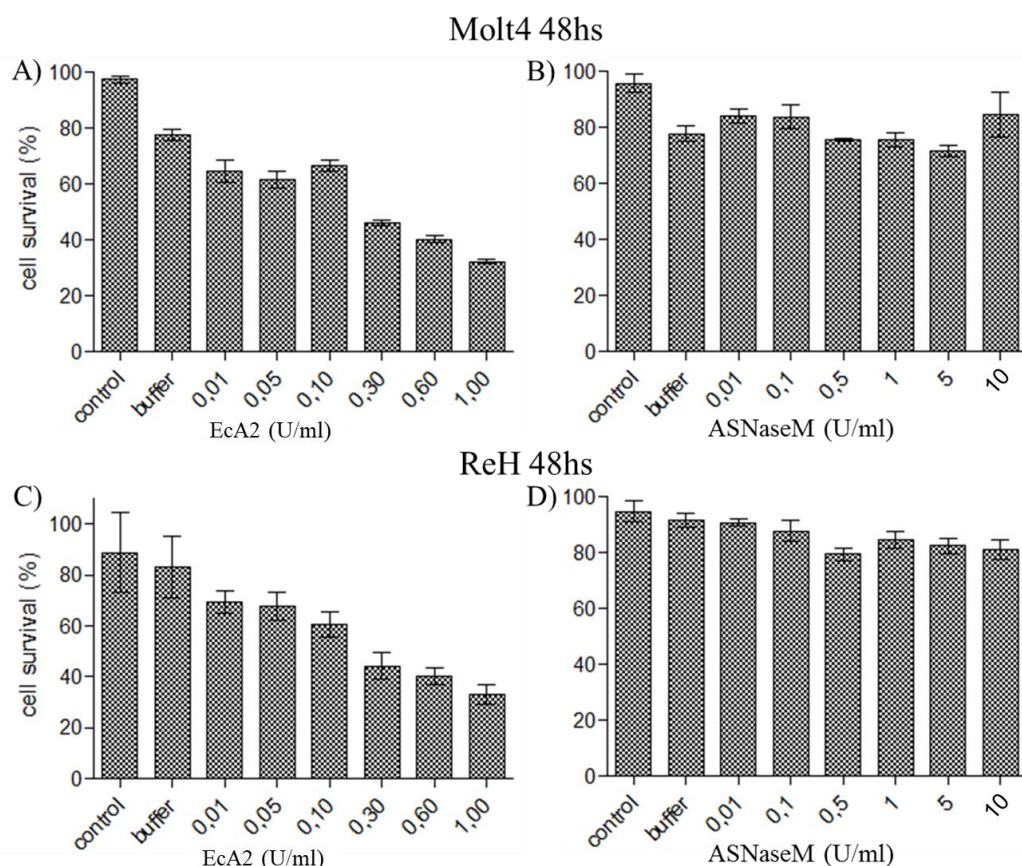


Figura 16: Avaliação da citotoxicidade de ASNaseM e EcA2 no período de 48 horas. As concentrações utilizadas de cada enzima foram de 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 U/ml para ASNaseM e 0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,6 e 1,0 U/ml para EcA2 em células tumorais das linhagens Molt-4 e ReH. A viabilidade celular das células cultivadas sem a enzima, após 48 horas, foi utilizada como controle.

No período de 72 horas, a enzima EcA2 foi capaz de matar 87% das células na concentração de 1,0 U/ml para a linhagem leucêmica Molt-4 (Figura 17A), enquanto que a enzima ASNaseM apresentou atividade reduzida, mesmos em concentrações altas (10,0 U/ml), atingindo um máximo de 52,6% de atividade citotóxica (Figura 17B). Já para a linhagem ReH (ASNS⁺), a atividade citotóxica de EcA2 foi menor quando comparado com Molt-4, com um máximo de 72,15% de morte celular (Figura 17C), enquanto que para ASNaseM, enzima que não possui atividade de glutaminase, não foi possível observar atividade citotóxica (Figura 17D), inviabilizando o cálculo de CC₅₀ de ASNaseM para a linhagem ReH. Para Molt-4 o CC₅₀ observado foi de 1 U/ml, enquanto que o CC₅₀ de EcA2 para a linhagem Molt-4 foi de 0,01U/ml.

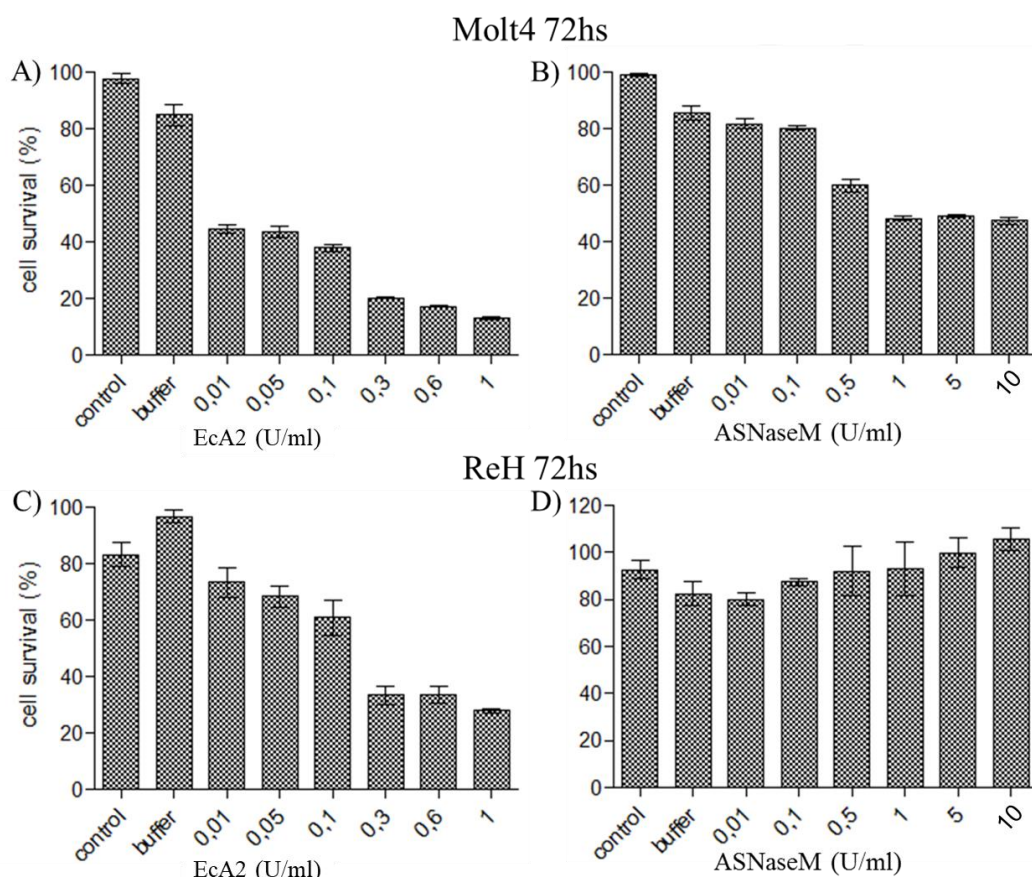


Figura 17: Avaliação da citotoxicidade de ASNaseM e EcA2 no período de 72 horas. As concentrações utilizadas de cada enzima foram de 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 U/ml para ASNaseM e 0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,6 e 1,0 U/ml para EcA2 em células tumorais das linhagens Molt4 e ReH. A viabilidade celular das células cultivadas sem a enzima, após 72 horas, foi utilizada como controle.

Nesta etapa do trabalho, foi possível padronizar a expressão e purificação de uma asparaginase, denominada ASNaseM, que apresenta características favoráveis quanto à estrutura e atividade, uma vez que a enzima é termo estável, isenta de atividade glutaminase e significativamente menor ($\sim 4 \times$ menor que as enzimas comerciais). Também investigamos a possibilidade de ganho de função (no caso GLNase) desta enzima por meio de mutações sítio dirigidas de aminoácidos envolvidos na catálise ou no ambiente do sítio ativo, entretanto estas abordagens não foram capazes de conferir atividade de GLNase, mas todos levaram a uma diminuição significativa na atividade de ASNase, o que indica que a importância na atividade de decomposição de Asn é mantida na enzima de levedura, mas que os determinantes estruturais relacionados à atividade de GLNase são distintas. Adicionalmente, a enzima ASNaseM apresentou atividade citotóxica para as células neoplásicas ASNS⁺, mesmo que menor em relação a asparaginase bacteriana, o que reflete os valores de $S_{0.5}$ observado para ASNaseM (0,355 mM).

Apesar de não ter sido possível a determinação da estrutura cristalográfica de ASNaseM, as análises apresentadas nesta seção indicam fortemente que a enzima ASNaseM de *S. cerevisiae* apresenta características estruturais distintas das descritas para as enzimas de bactérias e humanos, que são tetraméricas, e também revelam a importância da remoção da cauda de His para análises estruturais e funcionais de proteínas recombinantes. Contudo, a obtenção de uma ASNase com características peculiares nos levou a investigar a variabilidade desta família de enzimas.

4.2 Variabilidade Funcional e Estrutural de Asparaginases

4.2.1. Estudos filogenéticos das Asparaginases

Como mencionado anteriormente, as enzimas que possuem atividade de asparaginase são subdivididas em três famílias de asparaginases, com base em alinhamentos de sequências, propriedades bioquímicas e dados cristalográficos: asparaginases do tipo planta, asparaginase do tipo *Rhizobium etli* e asparaginases de tipo bacteriano (Borek; Jaskólski, 2001; Michalska; Jaskolski, 2006). As asparaginases do tipo bacteriano são divididas em tipo I, enzimas citosólicas que são expressas constitutivamente e com baixa afinidade por Asn; e enzimas do tipo II, com expressão induzida durante a anaerobiose e com alta afinidade por Asn (Michalska; Jaskolski, 2006; Schalk *et al.*, 2014). Entretanto, esta classificação é confusa pois enzimas de organismos altamente distintos como arquea e eucariotos, incluindo mamíferos (Michalska; Jaskolski, 2006), e a ASNaseM de *S. cerevisiae*, representam um grupo heterogêneo com peculiaridades funcionais e estruturais, mas são classificadas como ASNases bacterianas. Quando é utilizado o InterProScan, ferramenta utilizada para o reconhecimento de domínios de proteínas, as ASNases são classificadas em três tipos, no entanto, a nomenclatura utilizada é bastante redundante, resultando em três diferentes famílias de asparaginases: 1) ASNases que apresentam o domínio asparaginase (InterPro: IPR006034), que são denominadas de tipo bacteriana na classificação atual; 2) ASNases que apresentam o domínio asparaginase 2 (InterPro: IPR029055), denominadas de tipo planta na classificação atual; e 3) ASNases que apresentam o domínio asparaginase II (InterPro: IPR010349), que são as asparaginases do tipo *R. etli* na classificação atual (Quevillon *et al.*, 2005). Visando contribuir para uma classificação mais informativa destas enzimas investigamos, por meio de ferramentas de bioinformática, aspectos evolutivos, estruturais e funcionais das ASNases.

4.2.2 Triagem inicial e classificação de ASNases

As três diferentes famílias de asparaginases foram denominadas aqui de Classe 1, 2 ou 3. Na classe 1 (anteriormente denominada de ASNases do tipo bacteriano ou domínio de Asparaginase pelo InterProScan: IPR006034) foram agrupadas 198 sequências abrangendo as asparaginases de metazoários, bactérias, fungos, algas e arquea; a classe 2 (anteriormente denominada de ASNases de plantas ou domínio de Asparaginase 2 pelo InterProScan: IPR029055) apresentou 107 representantes oriundos de metazoários, bactérias, fungos, algas, arquea e plantas; a classe 3 (anteriormente denominada de ASNases do tipo *Rhizobium etli* ou

domínio de Asparaginase II pelo InterProScan: IPR010349) apresentou o menor número de representantes dentro do espaço amostral (32) e as ASNases são oriundas de bactérias e fungos (Figura 18). De forma geral os resultados revelam uma notável variabilidade de enzimas denominadas como asparaginases, o que reflete as diversas funções biológicas que podem executar e serão discutidas a seguir.

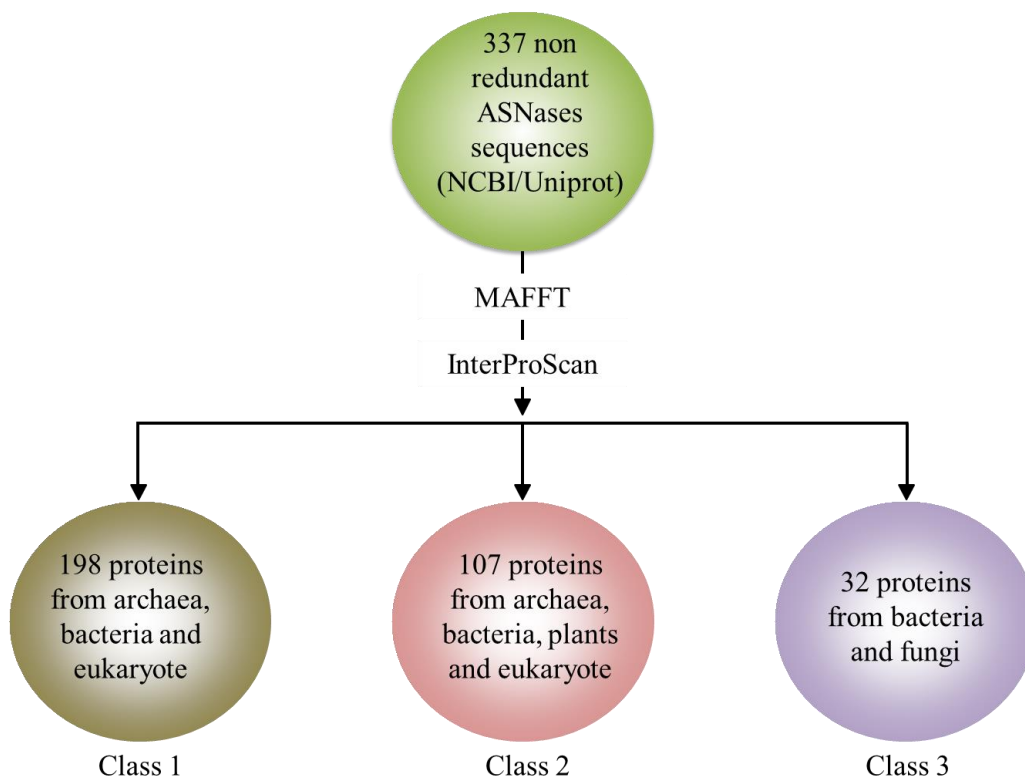


Figura 18: Agrupamento filogenético de sequências não redundantes de ASNases. O agrupamento filogenético foi efetuado utilizando 337 sequências não redundantes de ASNases por meio das ferramentas MAFFT e InterProScan e está em acordo com as propostas anteriores (Michalska *et al.* 2006; InterProScan), no entanto foram nomeadas de classes, levando em conta a abundância de sequências de diversos organismos presente em cada classe.

Primeiramente, a classe 1 apresentou 41 sequências contendo domínio(s) de anquirina (ank), e a estrutura das sequências do domínio de asparaginase podem ser facilmente divididos em 4 regiões distintas: região N-terminal, domínio asparaginase, região C-terminal altamente conservada e domínio de anquirina (presente em 41 sequências). Posteriormente, a lista das sequências foi submetida a realinhamento utilizando apenas o domínio de asparaginase e região C-terminal, uma vez que essas regiões são bem conservadas em todos os representantes. Para os domínios de asparaginase 2 e II, somente a região contendo os respectivos domínios foram utilizados. Posteriormente, após a seleção do modelo LG+I+G pelo programa ProtTest3 (Darriba *et al.*, 2017), as árvores foram construídas e analisadas a seguir.

4.2.3 Proteínas da Classe 1 apresentam grande diversidade e incluem enzimas utilizadas como biofármacos

A Classe 1 é a que apresenta maior número de representantes nas sequências analisadas (198), no entanto é bastante heterogênea no que concerne a sua estrutura primária e estão incluídas as asparaginases com maior relevância biotecnológica (ex: EcA2 e ErA2). Quando as sequências são analisadas, é possível observar que a classe 1 possui ASNases representantes de arquea, bactérias, protistas, algas, fungos e metazoários (Figura 19), mas não de plantas. Adicionalmente, possuem propriedades biológicas distintas, como localização celular e afinidade pelo substrato, e podem ser divididas em quatro grupos, de acordo com características estruturais, funcionais e filogenéticas distintas (Figura 19) (Tabela 3).

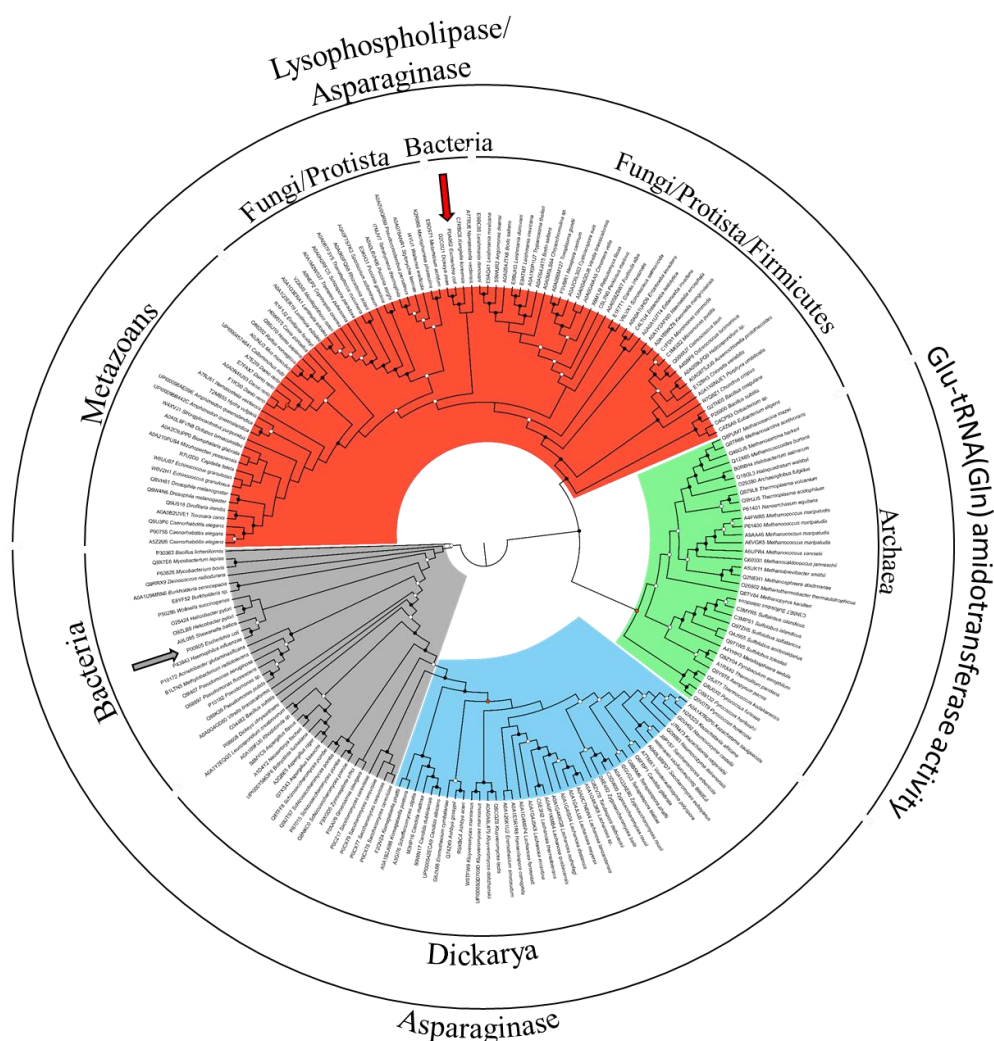


Figura 19: Árvore filogenética de máxima verossimilhança da Classe 1 de ASNases. A árvore foi circularizada e o ponto médio foi enraizado para fins de exibição. Pontos pretos indicam valores de suporte de *bootstrap* (100 réplicas) $\geq 75\%$ e probabilidade posterior bayesiana (PP) $\geq 0,9$; pontos vermelhos indicam valores de suporte de *bootstrap* $\geq 75\%$ e PP $\leq 0,9$; e pontos brancos indicam valores de suporte de *bootstrap* $\leq 75\%$ e PP $\geq 0,9$. A árvore filogenética do domínio ASNase apresentou quatro grupos principais colorizados em cinza, azul, verde e vermelho. A seta vermelha indica a asparaginase de *E. coli* tipo 1 e a seta azul indica a asparaginase de *E. coli* tipo 2.

◆ Grupo 1: Asparaginases de bactérias e homólogas do sub-reino Dikarya (Figura 19 – cinza), incluindo as enzimas de utilização biotecnológicas (EcA2 e ErA2). Na forma madura possuem 330 resíduos de AA (35kDa). Podem se localizar no citosol (ex. ASNase de *Helicobacter pylori*) ou, na forma de pro-proteína, possuem ~ 20 resíduos de AA N-terminais que codificam um peptídeo sinal para exportação para o periplasma, como exemplo, as ASNases periplasmáticas ErA2 e EcA2, que são amplamente utilizadas em tratamentos de neoplasias, em especial as hematológicas (Lopes *et al.*, 2017), devido ao baixo valor de K_m (EcA2 = 15 μ M e ErA2 = 48 μ M) sobre Asn (Nguyen *et al.*, 2016a). De fato, a EcA2 é a asparaginase mais estudada e a estrutura cristalográfica foi determinada em 1993, por Swain e colegas. A asparaginase 2 de *Saccharomyces cerevisiae* é um dos representantes do sub-reino Dykaria deste grupo, uma enzima de ~38kDa com 362 AA, no entanto, seu K_m sobre Asn é de 0,27 mM (Dunlop *et al.*, 1980).

◆ Grupo 2: Asparaginases de representantes do sub-reino Dikarya com sequências com 50 resíduos N-terminais adicionais de função desconhecida que elevam a massa molecular destas enzimas para ~ 41kDa (Asp1 de *S. cerevisiae*) (Figura 19 – azul). A análise com programa especializados para identificação de peptídeos de endereçamento não revelam sinais de endereçamento para proteína o que pode indicar funções desconhecidas desta região nestas enzimas. A única enzima caracterizada até o presente momento, que possui o prolongamento, é representada pela Asp1 de *S. cerevisiae*, a qual apresenta comportamento alostérico (Costa *et al.*, 2016). Este grupo não apresenta nenhum representante com estrutura cristalográfica depositada no PDB.

◆ Grupo 3: Constituído por enzimas de Arquea denominadas de Glutamil-tRNA amidotransferase D (GatD) que possuem um prolongamento N-terminal de ~ 90 resíduos de AA, totalizando ~ 450 resíduos (GatD de *Pyrococcus abyssi*) alcançando massa molecular de ~ 50kDa (Figura 19 – verde). O prolongamento N-terminal responde pela formação de heterodímeros com a enzima Glutamil-tRNA amidotransferase E (GatE). Estas enzimas atuam como uma amidotransferase em Glu-tRNA(Gln) acilado erroneamente para produzir Gln-tRNA(Gln). No entanto, além de usar glutamina, a asparagina também pode ser usada como um doador de amida (Schmitt *et al.*, 2005).

◆ Grupo 4: Representantes deste grupo podem conter sequências de domínio anquirina na região C-terminal, compostos por repetições de 33 resíduos de AA que medeiam interações proteína-proteína, e podem ser citosólicas ou secretadas (Figura 19 – vermelho)

(Belviso *et al.*, 2017; Menniti *et al.*, 2010; Schalk *et al.*, 2014). Sua cadeia polipeptídica consiste de ~ 560 resíduos de AA (protótipo: ASNase1 de *Cavia porcellus*) e possui massa molecular de 60kDa. Além da atividade de asparaginase (K_m na faixa de μM -mM), podem exibir atividade de lisofosfolipase, transacetilase e acetil-hidrolase (Karamitros; Konrad, 2014; Rigouin *et al.*, 2017; Sugimoto; Yamashita, 1999); também está incluída a ASNase tipo 1 de *E. coli*, que não possui domínio de anquirina, uma enzima citosólica com cadeia polipeptídica de 338 AA, massa molar de 37 kDa e atividade de asparaginase com comportamento alostérico, porém baixa afinidade ($S_{0.5}$ na faixa de mM) (Yun *et al.*, 2007).

Table 3: Class 1 Asparaginases

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Function	Metabolic (ASNase)	Metabolic (ASNase)	Repair (Glu-tRNA(Gln) amidotransferase)	Metabolic (Lysophospholipase and asparaginase)
Nº AA/ Molecular weight	~330 AA / 35kDa	383 AA / ~41kDa	~450 AA / ~50kDa	~560 AA (~60kDa) 338 AA (37kDa)
Extensions	-	N-terminal tail (~50 AA)	N-terminal tail (~90 AA)	Ankyrin domain sequences (C-terminal region)
Cellular location	Periplasm or cytosol	N.D.	Cytosol	Cytosol or secreted
K_m or $S_{0.5}$	$K_m = \mu\text{M}$ -mM	$S_{0.5} = 75 - 355 \mu\text{M}$	N.D.	$K_m = \mu\text{M}$ $S_{0.5} = \text{mM}$
Representatives	EcA2 and ErA2	Asp1 from <i>S. cerevisiae</i>	GatD from <i>Pyrococcus abyssi</i>	gpASNase1, hsASNase1 and EcA1
Oligomeric state	Homotetramer	Monomer	Heterodimer (GatE)	Homotetramer

Adicionalmente, através do software MEME, foi possível observar regiões de aminoácidos altamente conservados para os diferentes membros da classe 1: motivo 1: T-G-G-T e motivo 2: H-G-T-D-T (Borek; Jaskólski, 2001), com alta significância estatística ($E = 1,1\text{e-}1431$ para a região contendo o motivo 1 e $E = 7,0\text{e-}2668$ para a região contendo o motivo 2). Os motivos 1 e 2 foram encontrados em todas as 198 ASNases desta classe e possuem resíduos de grande importância na atividade catalítica. De fato, na asparaginase 2 de *E. coli*, o Motivo 1 (9-T-G-G-T-12) contém o resíduo de treonina 12, que estabiliza o substrato no sítio ativo e o Motivo 2 (87-H-G-T-D-T-91) contém o resíduo de treonina 89, que promove a protonação do grupo amino de saída e ativa uma molécula de água nucleofílica (Sanches *et al.*, 2007).

Por fim, um terceiro motivo não caracterizado (297-L-N-P-X-K-X-R-303 em ASNase 2 de *E. coli*) foi encontrado somente em uma parcela das sequências presentes para os clados formados pelos grupos 1 e 2 (cinza e azul – Figura 19) e se localiza na região C-terminal, apresentando grande relevância estatística ($E = 3,7\text{e-}935$). Adicionalmente, já foi relatado que os resíduos Q300, e R303 assim como Y218 quando substituídos por alanina, afetam a

estabilidade do dímero AC (Mezentsev *et al.*, 2011). Neste contexto, o motivo 3 pode conter resíduos importantes na formação dos dímeros íntimos.

No que concerne às estruturas cristalográficas determinadas para membros de asparaginases da classe 1, existe uma notável conservação da estrutura tridimensional dos monômeros dos diferentes grupos. Apesar das enzimas apresentarem baixa identidade na sequência de aminoácidos (< 30%) a estrutura tridimensional dos monômeros destas proteínas apresentam elevada identidade espacial. Em todos os casos, as ASNases possuem dois domínios globulares do tipo α/β e em ambos os domínios globulares possuem uma folha β circundada de α hélices (Figura 20A). Quando EcA1 (Figura 20 B) e EcA2 (Figura 20 C) são comparadas, os desvios quadráticos médios (*root mean square deviation*) dos C α na cadeia de aminoácidos são de 2,5 Å, sendo que as enzimas compartilharam também grande similaridade com gpASNase1 de porquinho da índia (r.s.m.d ~1,2 Å) (Figura 20 B-E). Entretanto, cabe ressaltar que as representações gráficas de gpASNase1 não incluem as repetições de anquirina C-terminal, pois não estavam presentes nas estruturas (Figura 20 D). Quando EcA2 é comparada com a enzima do grupo 3 (GatD de *P. abyssi*) (Figura 20 C), é observado também uma grande identidade estrutural (r.s.m.d ~1,5 Å). De forma geral os resultados indicam que mesmo com reduzida identidade de AA, a estrutura terciária é altamente conservada em razão de uma ancestralidade comum.

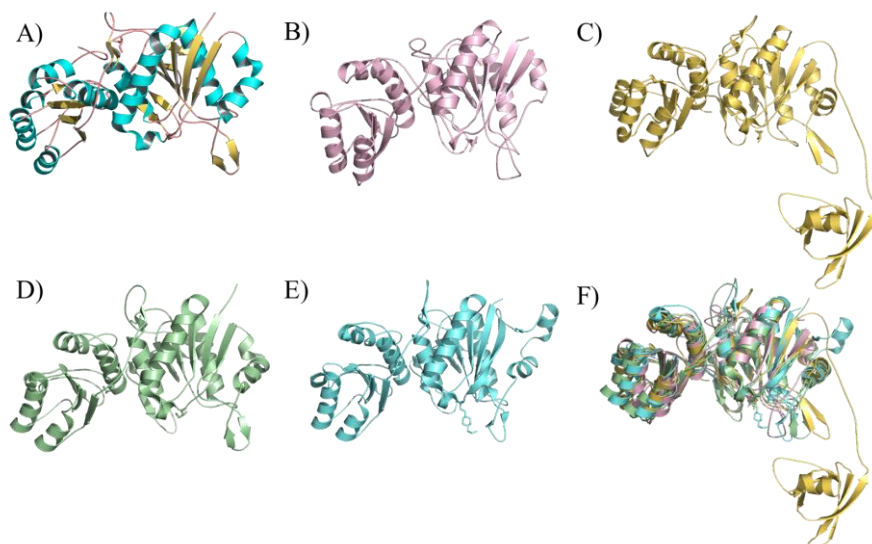


Figura 20: Estruturas cristalográficas de monômeros de ASNases da Classe 1. A) ASNases da Classe 1 apresentam dois domínios globulares de enovelamento do tipo α/β , com uma folha β central, envolvidos por α hélices de ambos os domínios. Os elementos da estrutura secundária estão coloridos da seguinte forma: α hélice = azul claro; fitas β = amarelo e *loops/random coils* = rosa (protótipo: EcA1, 2P2D). Como representante do grupo 1 da classe 1 é apresentada a estrutura de EcA2 de *E. coli* (rosa, 3ECA) (B); do grupo 3 GatD de *P. abyssi* (amarelo; 1ZQ1) (C); e do grupo 4 EcA1 de *E. coli* (verde, 2P2D) (D) e gpASNase1 de porquinho da índia (azul claro; 4R8K) (E). Sobreposição dos monômeros de ASNases da Classe 1 (F).

Quando são analisadas as estruturas quaternárias, fica evidente que as enzimas também compartilham grande homologia, com exceção de GatD (Figura 20 C). Quando analisamos os motivos encontrados nas ASNases da classe 1, apesar de estarem distantes na sequência de aminoácidos, se apresentam em grande proximidade espacial devido ao enovelamento das enzimas (Figura 21).

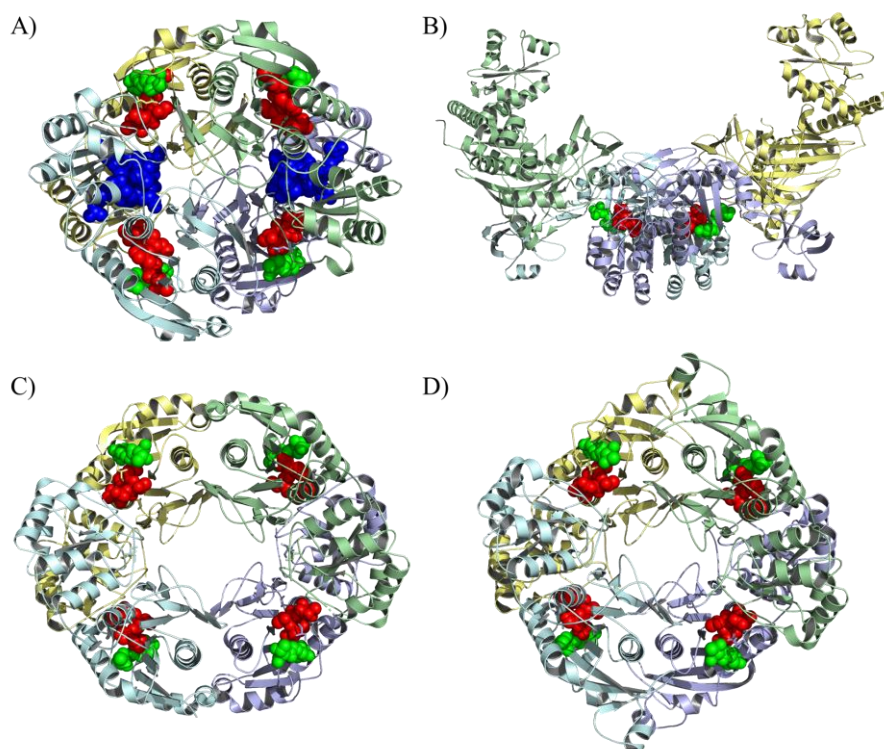


Figura 21: Estruturas cristalográficas quaternárias de ASNases da Classe 1. Estruturas cristalográficas da unidade biológica (funcional) de ASNases da Classe 1. **A)** Homotetrâmero de Eca2 de *E. coli* com os monômeros representados em diferentes cores (verde, azul, amarelo e ciano) (pdb: 3ECA). **B)** Heterotetrâmero de GatDE de *Pyrococcus abyssi*. As duas subunidades com atividade de ASNase (GatD) estão coloridas em ciano e azul, enquanto que as duas subunidades GatE estão coloridas em verde e amarelo (pdb: 1ZQ1). **C)** Homotetrâmero de Eca1 de *E. coli* com os monômeros colorizados em verde, azul, amarelo e ciano (pdb: 2P2D); **D)** Homotetrâmero de ASNase de porquinho da índia (GpASNase) com os monômeros representados em diferentes cores (verde, azul, amarelo e ciano) (pdb: 4R8K). Os motivos conservados são representados por esferas sendo que o motivo 1 está colorido em verde, o motivo 2 em vermelho e o motivo 3 em azul.

4.2.4 Asparaginases da Classe 2: diversidade funcional e conservação estrutural

Trabalhos anteriores classificam enzimas deste grupo como ASNases de plantas (Michalska; Jaskolski, 2006) ou asparaginase 2 (InterProScan). No entanto, as análises filogenéticas revelam que, além das plantas, este grupo de enzimas podem ser encontradas em bactérias, como Eca3 de *E. coli*, arquea e também em outros eucariotos, incluindo *H. sapiens* (Figura 22). Portanto, na classificação sugerida nomeamos as enzimas deste grupo como Classe 2 (Tabela 4).

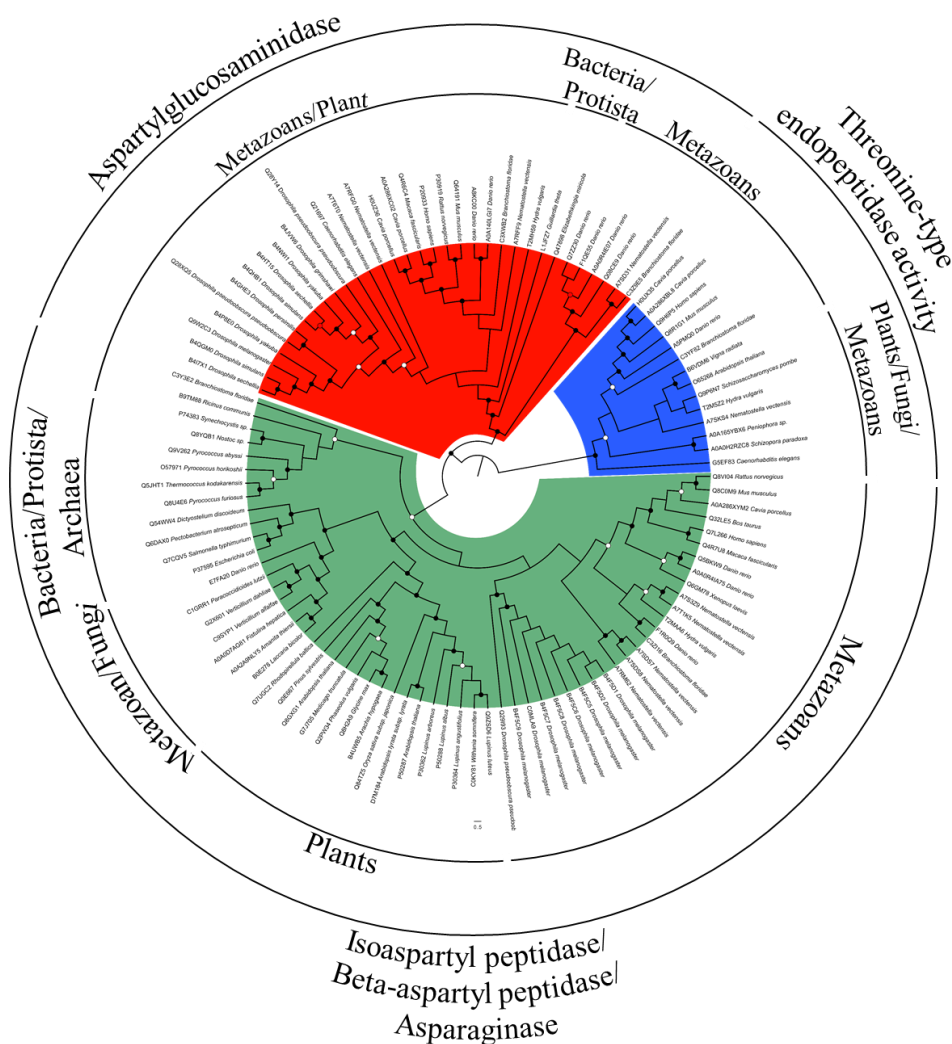


Figura 22: Árvore filogenética de máxima verossimilhança de ASNases da Classe 2. A árvore foi circularizada e o ponto médio foi enraizado para fins de exibição. Pontos pretos indicam valores de suporte de *bootstrap* (100 réplicas) $\geq 75\%$ e probabilidade posterior bayesiana (PP) $\geq 0,9$; os pontos brancos indicam valores de suporte de *bootstrap* $\geq 75\%$ e PP $\leq 0,9$; e pontos vermelhos indicam valores de suporte de *bootstrap* $\leq 75\%$ e PP $\geq 0,9$. A árvore filogenética da classe 2 apresenta 3 grupos principais (clado verde, clado vermelho e azul).

Enzimas deste grupo são bastante diversas no que tange a sua atividade biológica, apesar de apresentarem atividade de asparaginase, biologicamente esta pode não ser sua função principal (Hejazi *et al.*, 2002), pois também podem hidrolisar dipeptídeos de β aspartil, participar no metabolismo de oligossacarídeos, ou mesmo apresentar atividade de treonina endopeptidase (Cantor *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2005). Neste contexto, é importante salientar que os principais clados também representam três grandes grupos funcionais:

◆ Grupo 1: A este grupo pertencem as Isoaspartil peptidases/ β -aspartil peptidases/asparaginases e tem como protótipo Eca3, uma proteína de 321 resíduos de AA (35kDa) e hASRGL1 de humano, com 308 resíduos de AA (32 kDa) (Figura 22 - clado verde). Possuem como principal função a hidrolisar resíduos de Asn e de L-iso-aspartil (também conhecidos como resíduos β -Asp), produtos de dano espontâneo a proteínas. Em

cianobactérias também respondem pela degradação da cianoficina, um polímero encontrado na maioria das espécies de cianobactérias constituído de uma cadeia principal de aspartato com resíduos de lisina na cadeia lateral (Hejazi *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 1999; Bruneau *et al.*, 2006; Michalska *et al.*, 2005; Cantor *et al.*, 2009). Em eucariotos, estas enzimas podem ser encontradas associadas a mitocôndrias (Bush *et al.*, 2002), dentre elas, a enzima humana hASRGL1, também denominada de hASNase3 por ser homóloga a asparaginase de *E. coli* 3 (EcA3) (Li *et al.*, 2016; Nomme *et al.*, 2013). Em plantas este grupo de enzimas responde pela liberação da amônia a partir da asparagina, principal composto de armazenamento e transporte de nitrogênio nas plantas (Atkins *et al.*, 1975; Sieciechowicz *et al.*, 1988). A atividade da asparaginase em plantas tem sido estudada desde 1927 (Grover; Chibnall, 1927) e em 1980, dois grupos diferentes de ASNases de plantas foram descritos: aquelas independentes de potássio (K-independentes), enzimas que são insensíveis à presença de cátions do metal; e enzimas que possuem a atividade catalítica modulada pela presença de potássio (K-dependentes) (Sodek, 1980). Adicionalmente, as enzimas K-independentes possuem atividade isoaspartílica ou β -aspartil-peptidase, as quais impedem o acúmulo de grupos β -Asp em proteínas (Bruneau *et al.*, 2006; Michalska *et al.*, 2005).

◆ Grupo 2: Este grupo é constituído de endopeptidases a qual cliva substratos após resíduos de aspartato e apresenta localização nuclear em eucariotos (Khan *et al.*, 2005; Niizuma *et al.*, 2015) (Figura 22 – Clado azul). A isoforma de humanos Treonina aspartase 1 (Taspase1) possui 420 AA e massa molecular de 45kDa. A Taspase1 responde pela clivagem de KMT2A (Histona-lisina N-metiltransferase 2A) envolvida na regulação da expressão gênica durante as fases iniciais da hematopoese e sua superexpressão está envolvida com neoplasias hematológicas, incluindo a LLA (Ziemin-van der Poel *et al.*, 1991). Uma vez que Taspase1 está diretamente ligada a neoplasias, sua relevância biotecnológica baseia-se no desenvolvimento de moléculas inibidoras (Niizuma *et al.*, 2015; Wünsch *et al.*, 2016).

◆ Grupo 3: As aspartilglucosaminidases representam as enzimas pertencentes a este grupo e possuem atividade de amido-hidrolase envolvida no catabolismo de oligossacarídeos (Figura 22 - clado vermelho). Possuem aproximadamente 346 AA, entretanto os primeiros 10 AA correspondem a um peptídeo sinal, portanto a massa da proteína madura é de 36kDa (ASPG de *Rattus norvegicus*). Em eucariotos, elas se encontram no lisossomo e estão relacionadas com a decomposição de proteínas glicosiladas efetuando a clivagem da ligação glicosídica entre o carboidrato e um resíduo de Asn (Enomaa *et al.*, 1992; Makino *et al.*,

1968). Este grupo de enzimas é muito bem estudado e pode ser encontrado em bactérias e eucariotos (Qian *et al.*, 2003; Tollersrud; Aronson, 1989; Xuan *et al.*, 1998).

Table 4: Class 1 Asparaginases

	Group 1	Group 2	Group 3
Function	Repair / Metabolic (Isoaspartyl peptidases/ asparaginases)	Gene regulation (Endopeptidases: cleaves substrates after aspartate residues)	Metabolic (Aspartylglucosaminidases)
Nº AA/ Molecular weight	~321 AA / ~35kDa	~420 AA / ~45kDa	346 AA (10 AA - peptídeo sinal) (36kDa)
Cellular location	Cytosol	Nucleus	Lysosome
K_m	mM	mM	mM
Representatives	EcA3, hASRGL1, plants	Human Taspase1	ASPG from <i>Rattus norvegicus</i>
Oligomeric state	Heterotetramer	Heterotetramer	Heterotetramer
Observation	In plants: K-independent or K-dependent	Involved with hematological neoplasms (LLA) Inhibiting molecules	Decomposition of glycosylated proteins

No que concerne a afinidade por Asn, para o grupo de Isoaspartil peptidases/asparaginases, foi demonstrado que tanto para as K⁺ independentes quanto as K⁺ dependentes de plantas e enzimas de mamíferos como (hASNase3 e gpASNase3), que o valor do K_m reside na faixa de milimolar o que as tornam impróprias para finalidades terapêuticas (Ajewole *et al.*, 2018; Nomme *et al.*, 2014; Schalk; Lavie, 2014). No que tange as Treonina aspartases, sua atividade de endopeptidase, não é ideal para um candidato ao desenvolvimento de um biofármaco para o tratamento da LLA (Niizuma *et al.*, 2015; Wünsch *et al.*, 2016).

No que tange aos aspectos estruturais, as enzimas da Classe 2 possuem, em comum, uma organização espacial mais complexa que as da Classe 1. De fato, as ASNases da Classe 2 são hidrolases nucleófilas N-terminais (Michalska *et al.*, 2008; Michalska; Jaskolski, 2006). Recebem esta denominação pois são expressas como um precursor polipeptídico único inativo o qual sofre uma clivagem intramolecular autocatalítica, dividindo a cadeia polipeptídica em duas subunidades ativas: subunidade α e subunidade β expondo o aminoácido nucleófilo N-terminal (treonina, serina ou cisteína) da subunidade β . Portanto uma única cadeia polipeptídica é capaz de formar um heterodímero $\alpha\beta$ (Michalska; Jaskolski, 2006).

Curiosamente, uma vez que representantes desta classe podem exercer funções biológicas bastante distintas e apresentarem identidade moderada (25-40%), a análise do

enovelamento terciário de uma cadeia polipeptídica revela identidade estrutural bastante elevada mesmo quando comparado proteínas de organismos distintos como bactérias, plantas e de humanos, com r.m.s.d de somente 0.8-1.0 Å² (Figura 23). Os representantes desta classe possuem enovelamento α/β , apresentando duas folhas β sobrepostas no interior da molécula, circundadas por hélices do tipo α (Figura 23A). Cabe ressaltar que o enovelamento é bastante distinto das enzimas que possuem estrutura determinada da Classe 1 (Figura 20).

Adicionalmente, as enzimas desta classe também são capazes de se organizar em tetrâmeros, entretanto diferente de alguns representantes da Classe 1, as quais são formadas por quatro cadeias polipeptídicas idênticas (ex: EcA2 de *E. coli* e gpASNase1), nas enzimas da classe 2, o tetrâmero é formado por duas cadeias polipeptídicas hidrolisadas resultando em heterotetrâmeros (Figura 24A-F) (Hsieh *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2016; Michalska; Jaskolski, 2006; Nomme *et al.*, 2014).

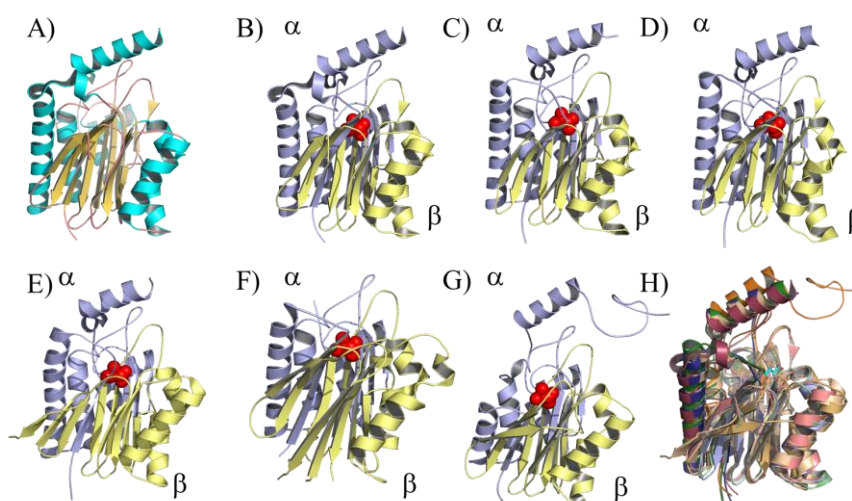


Figura 23: Estruturas cristalográficas da cadeia polipeptídica de ASNases da Classe 2. Em A) é apresentada a estrutura de uma cadeia polipeptídica de ASNases da Classe 2, que denota uma estrutura do tipo α/β , em que duas folhas β centrais sobrepostas, oriundas de elementos de ambas as subunidades, são circundadas por α hélices. Os elementos da estrutura secundária são coloridos da seguinte forma: α hélice = azul claro; fitas β = amarelo e loops/random coils = rosa (PDB: 2ZAL). Em B-G são apresentadas as estruturas de cadeias polipeptídicas de enzimas da classe 2 do grupo 1 como EcA3 de *E. coli* (PDB: 2ZAL) (B), ASNase K-dependente de *Phaseolus vulgaris* (PDB: 4PU6) (C), ASNase K-independente de *Lupinus luteus* (PDB: 2GEZ) (D) e ASNase 3 de humanos (hASNase 3) (PDB: 4PVS) (E). As enzimas do grupo 2 da classe 2 estão representadas pela Treonina aspartase 1 de humanos (Taspase1) (PDB: 2A8J) (F) e enzimas do grupo 3 da classe 2 estão representadas pela Aspartilglicosaminidase de humanos (AGA) (PDB: 1APZ) (G). Sobreposição de cadeias polipeptídicas clivadas de ASNases da classe 2 (H). Nas representações de B a H, a subunidade α está colorida em azul, enquanto a subunidade β está em amarelo. O resíduo catalítico de treonina N-terminal está representado por esferas vermelhas.

Adicionalmente, através do programa MEME, foi possível identificar dois motivos de aminoácidos altamente conservados, característicos do grupo de enzimas da classe 2. O motivo 1 é representado pela sequência 168-T/Q-V/I/L-G-X-V/I/L-X₍₂₎-D/H-X₍₂₎-G/N-179, em ASGL1 humana, e possui um resíduo essencial para a função da enzima. De fato, neste

motivo está localizado o resíduo de Thr168 na enzima humana Isoaspartil peptidase (ASGL1) onde ocorre a clivagem entre as cadeias α e β . O motivo 2 185-S-T/S-T/S-X-G-X₍₃₎-K/R- X₍₃₎-G-R-V/I-G-200, em ASGL1 humana, apresenta a Thr186 que possui atividade catalítica (Li *et al.*, 2016). Ambas as regiões contendo os motivos têm significância estatística bastante elevada ($E = 8,2$ e -676 para o motivo 1 e $E = 3,6e-1335$ para o motivo 2). Ao analisar a unidade biológica, os heterotetrâmeros que compõe a enzima ativa, é possível constatar que os motivos estão localizados em grande proximidade espacial (Figura 24).

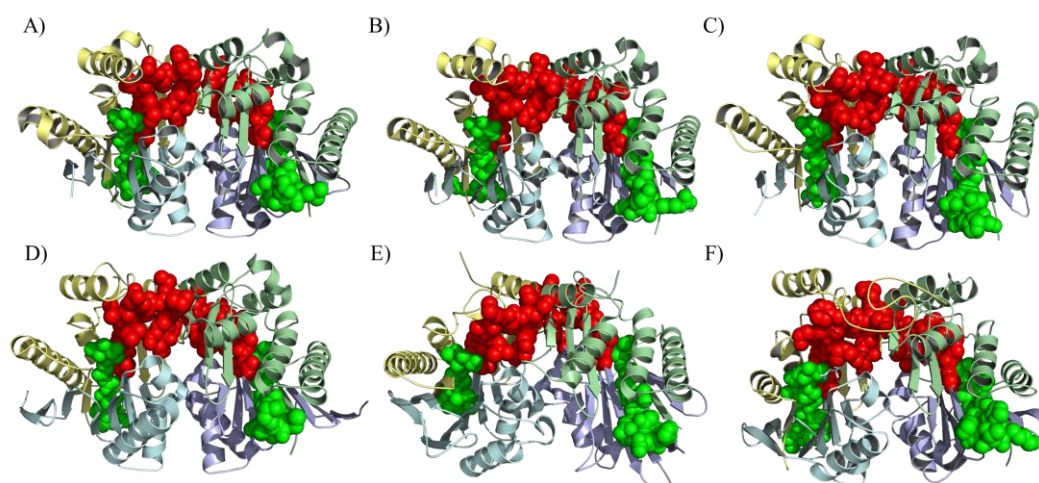


Figura 24: Análises da estrutura quaternária de Asparaginases da classe 2. **A)** Estrutura cristalográfica do heterotetrâmero de EcA3 (código PDB: 2ZAL). **B)** Estrutura cristalográfica do heterotetrâmero de asparaginase K-dependente de *P. vulgaris* (código PDB: 4PU6). **C)** Estrutura cristalográfica do heterotetrâmero de asparaginase K-independente de *L. luteus* (código PDB: 2GEZ). **D)** Estrutura cristalográfica do heterotetrâmero de hASRGL1 de *H. sapiens* (código PDB: 4PVS). **E)** Estrutura do heterotetrâmero da Taspase1 humana (código PDB: 2A8J). **F)** Estrutura do heterotetrâmero de AGA humano (código PDB: 1APZ). Cada monômero está representado por *cartoon* de cores diferentes, os motivos 1 e 2 estão representados por esferas verdes e vermelhas, respectivamente.

4.2.5 Asparaginases da Classe 3

Proteínas que pertencem a Classe 3, são tradicionalmente classificadas como asparaginases do tipo *Rhizobium etli*, uma bactéria simbiótica de plantas leguminosas (Moreno-Enriquez *et al.*, 2012), ou asparaginase II (InterProScan: IPR010349). Somente 32 proteínas não redundantes foram agrupadas nesta classe (Figura 25).

Esta classe engloba representantes de fungos, bactérias, incluindo a asparaginase de *Rhizobium etli*, e cianobactérias (Figura 25). A enzima de *R. etli* apresenta comportamento de Michaelis-Menten e valor de K_m de 8,9 mM e $k_{cat} / K_m \sim 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para o substrato Asn, enquanto que nenhuma atividade de glutaminase foi observada (Moreno-Enriquez *et al.*, 2012). Utilizando a enzima de *R. etli* como protótipo para a descrição, ela possui 370 AA e massa de ~40kDa. Adicionalmente, a asparaginase de *R. etli* mostrou uma mobilidade

eletroforética em PAGE nativo compatível a de um homodímero (Moreno-Enriquez *et al.*, 2012).

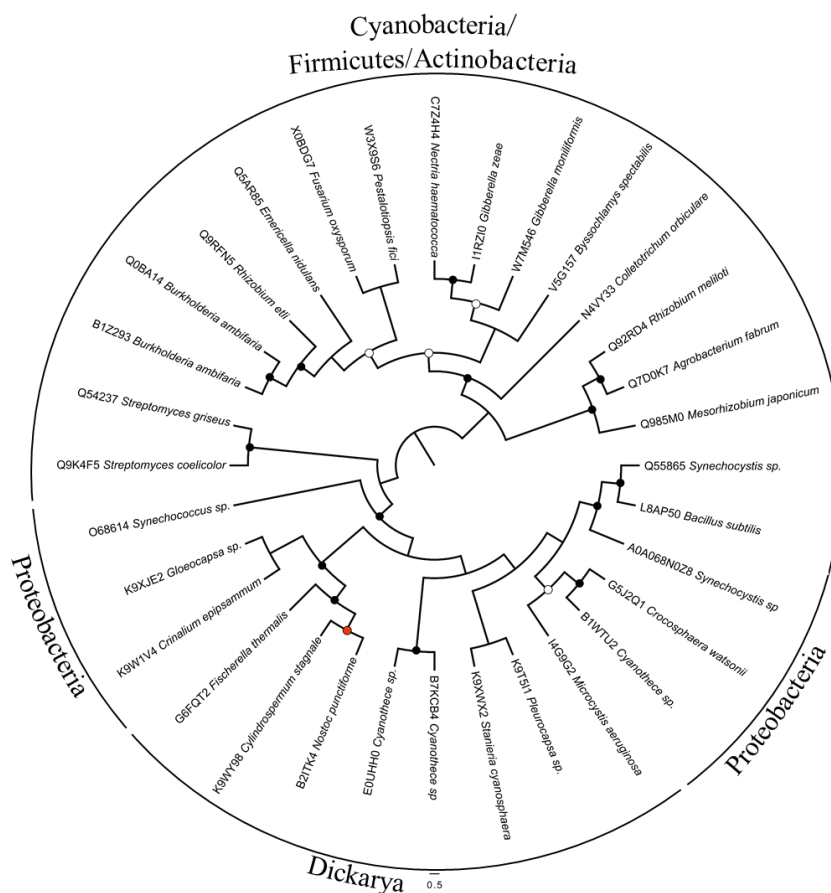


Figura 25: Árvore filogenética de máxima verossimilhança de ASNases da Classe 3. A árvore foi circularizada e o ponto médio foi enraizado para fins de exibição. Pontos pretos indicam valores de suporte de *bootstrap* (100 réplicas) $\geq 75\%$ e probabilidade posterior bayesiana (PP) $\geq 0,9$; os pontos brancos indicam valores de suporte de *bootstrap* $\geq 75\%$ e PP $\leq 0,9$; e pontos vermelhos indicam valores de suporte de *bootstrap* $\geq 75\%$ e PP $\geq 0,9$.

Também possui representantes de cianobactérias, e também possui representantes de actinobactérias e firmicutes (Figura 25). No entanto, poucos estudos caracterizaram essas enzimas e, entre os espécimes da árvore apresentada, apenas *Streptomyces griseus* possui estudos iniciais, uma enzima sem atividade de glutaminase, com atividade de asparaginase e localização extracelular (Meena *et al.*, 2015), no entanto os parâmetros cinéticos e estudos estruturais não foram efetuados.

Nesta classe também foi possível identificar dois motivos de aminoácidos altamente conservados: motivo 1: 51-R-S-X₍₂₎-K-P/A-X-Q-A-L-60 e motivo 2: 138 -N/G-C-S-G/A-K-H-X-G/A-M/F-146, ambos seguindo a numeração de ASNase de *R. etli*, e ambos os motivos têm significância estatística extremamente forte ($E = 3,9e-852$ e $E = 7,3e-791$, respectivamente). Embora o sítio ativo não seja caracterizado, para as outras classes de

asparaginases a catálise envolve ao menos dois resíduos de Thr e em alguns casos Ser. Neste contexto é importante salientar que nos dois motivos são encontrados resíduos de Ser (Ser52 e Ser140) os quais possuem uma carbonila γ que podem ser utilizadas na catálise. Visando ganhar mais informações, foi construído um modelo teórico para a ASNase de *R. etli* (Figura 26 A). O modelo gerado utilizando as coordenadas da glutaminase de *B. subtilis* (YBSA) (Brown *et al.*, 2008) a qual possui 21 % de identidade e 29 % de similaridade com a ASNase de *R. etli*. O modelo construído cobre do resíduo 26 ao 320 (de 371 resíduos). Uma vez que dados experimentais indicam que a ASNase de *R. etli* se comporta como um dímero (Moreno-Enriquez *et al.*, 2012), foi gerado o modelo homodimérico (Figura 26 B). Assim como nas demais classes, um ponto de importância é o fato de que os motivos conservados, apesar de estarem distantes na sequência, se localizam em grande proximidade em razão do enovelamento da enzima.

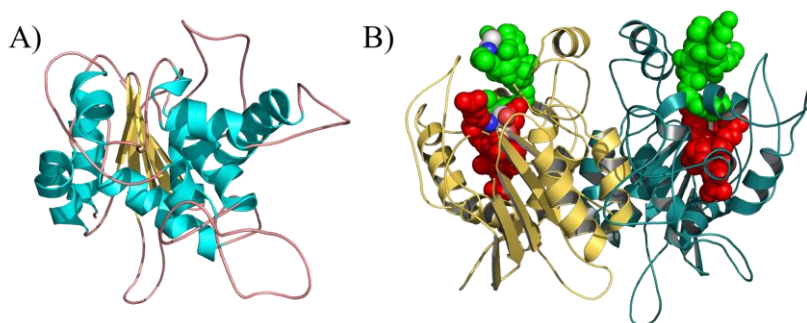


Figura 26: Modelo estrutural da ASNase da Classe 3 de *R. etli*. Representações do modelo da ASNase de *R. etli* na forma monomérica (A) e dimérica (B). No modelo monomérico, os elementos da estrutura secundária são coloridos da seguinte forma: α hélice = azul claro; fitas β = amarelo e loops/random coils = rosa. No modelo dimérico os motivos conservados são representados por esferas sendo que o motivo 1 está colorido em verde e o motivo 2 em vermelho. Os resíduos de Ser presentes nos motivos estão coloridos por CPK (C= branco, O= vermelho e N = azul). As figuras foram geradas utilizando o PyMol (www.pymol.com).

As análises filogenéticas conduzidas no âmbito deste trabalho levaram a elaboração da proposta de uma nova classificação mais robusta. As análises das sequências de aminoácidos a partir de asparaginase de plantas, fungos, metazoários, algas, protistas, arquea e bactérias propõe a divisão de enzimas em três classes, de acordo com aspectos filogenéticos, função enzimática, características estruturais e motivos conservados, englobando organismos evolutivamente distintos em uma mesma classe de asparaginases e utilizando uma nomenclatura mais apropriada. De fato, apesar de grupos com diferenças funcionais bastante marcantes, as enzimas da classe 1 e da classe 2, as quais possuem enzimas com estrutura tridimensional determinada, revelam que a ancestralidade evolutiva se estende de forma marcante às estruturas terciárias e quaternárias, independente de participar de processos biológicos distintos.

Adicionalmente, fica claro que somente para a Classe 1 foram categorizadas enzimas que possuem o K_m na faixa de micromolar como EcA2, ErA2 e gpASNase1, o que as torna aptas para a utilização em protocolos de tratamentos de neoplasias humanas. Entretanto, as razões de uma maior afinidade por substratos ainda não são claras e são alvo da investigação apresentada a seguir.

4.2.6 Busca por determinantes estruturais relacionados a afinidade pelos substratos Asn e Gln de enzimas terapêuticas

Dentre as ASNases das diferentes classes, somente as de bactéria da Classe 1 possuem aplicações terapêuticas em razão de possuírem K_m na faixa de micromolar e, portanto, conseguem depletar de forma eficiente a Asn da circulação sanguínea (Lopes *et al.*, 2017). Para aprofundar as análises de classes com enzimas similares, mas com K_m muito diferentes sobre Asn ou Gln, ou que apresentaram diferenças estruturais, duas novas árvores foram construídas, uma árvore utilizando 56 sequências de aminoácidos de ASNases com mais de 60% de similaridade com as ASNases de EcA2 e ErA2, e a segunda utilizando 133 sequências de aminoácidos de ASNases com 90% de similaridade com ASNases humanas e de porquinho-da-índia, totalizando 526 sequências de ASNases utilizadas nas análises envolvidas neste trabalho (Apêndice C).

É importante enfatizar que as ASNases mais estudadas estão incluídas no grupo 1 da classe1, que são as asparaginases 2 de *E. coli* (EcA2) e *Erwinia chrysanthemi* (ErA2), ambas enzimas comerciais utilizadas na LLA, (Labrou *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2017) devido ao baixo valor de K_m sobre Asn (na faixa de μM) (Nguyen *et al.*, 2016a). Apesar das ASNases bacterianas serem proteínas terapêuticas bem caracterizadas e muito importantes para o regime anticâncer para malignidades hematológicas, elas podem induzir resposta imune, produzindo anticorpos anti-ASNase, sendo a principal causa de resistência a drogas (Armstrong *et al.*, 2007; Avramis, 2012; Avramis; Panosyan, 2005). Reações de hipersensibilidade foram observadas em $\sim 60\%$ dos pacientes que utilizaram a enzima EcA2 (Panosyan *et al.*, 2004). A fim de reduzir as reações adversas causadas pela administração de EcA2, foi desenvolvido PEG-ASNase, que tem como vantagens uma meia-vida biológica mais longa do que a ASNase nativa e baixa imunogenicidade. No entanto, foi demonstrado que há reações imunológicas cruzadas entre ASNase nativa e PEG-ASNase, impedindo a permutabilidade entre as enzimas (Pieters *et al.*, 2011). Como alternativa às formulações de *E. coli*, a substituição por ErA2 é uma opção terapêutica. No entanto, a enzima ErA2 apresenta

uma meia-vida biológica mais curta do que a EcA2, 33% dos pacientes ainda apresentam reações alérgicas à formulação (Pieters *et al.*, 2011; Rizzari *et al.*, 2013), e maior valor de K_m sobre Asn (EcA2= 15 μ M e ErA2= 48 μ M) (Derst *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2016).

A análise da estrutura cristalográfica de EcA2 revela uma enzima homotetramérica (Swain *et al.*, 1993) e o monômero é muito conservado em comparação com as ASNases da classe 1 que detalhamos aqui, apresentando um domínio N-terminal, que contém os motivos 1 e 2 do domínio ASNase, e o motivo 3 no domínio C-terminal. A estrutura cristalográfica de ErA2 também foi determinada e ao comparar as duas estruturas das enzimas bacterianas, é possível constatar que existe uma característica marcante entre os aminoácidos envolvidos na catálise (Jaskólski *et al.*, 2001; Kravchenko *et al.*, 2008). Em ambas as ASNases, o mecanismo de reação possui o envolvimento de duas tríades catalíticas (Thr12-Tyr25-Glu283* e Thr89-Asp90-Lys162 em EcA2; e Thr15-Tyr29-Glu63 e Thr95-Asp96-Lys168 em ErA2), e o movimento de um *loop* contendo os resíduos 11 - 31 em EcA2 e 14 - 35 em ErA2, incluindo o resíduo de Thr catalítica do motivo 1 (12 em *E. coli* e 15 em *E. chrysanthemi*) (Anishkin *et al.*, 2015; Offman *et al.*, 2011; Sanches *et al.*, 2003). Entretanto, enquanto que na ASNase de *E. coli* o resíduo de Glu283 do monômero adjacente é responsável pela interação com o grupo N da cadeia principal do substrato e em aumentar a nucleofilicidade da Thr12, em *E. chrysanthemi*, o Glu63 do mesmo monômero exerce esta função, mas está localizado espacialmente em uma região distinta (Figura 27 A e B).

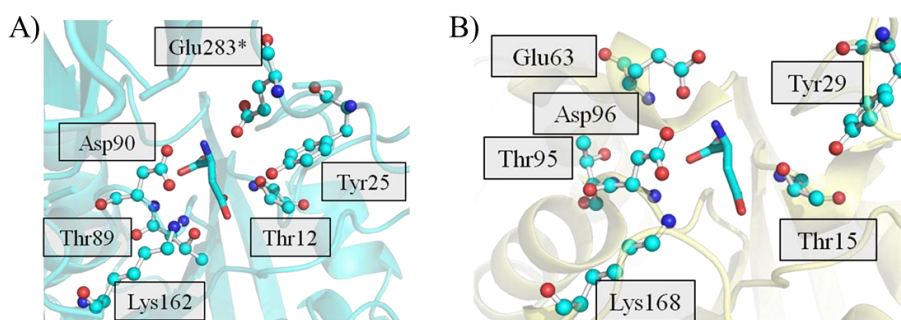


Figura 27: Resíduos do sítio ativo de ASNases bacterianas. Região do sítio ativo de ASNases de *E. coli* (A) e *E. chrysanthemi* (B) revela grande similaridade estrutural nas posições dos aminoácidos envolvidos que compõe duas tríades catalíticas, com exceção do resíduo Glu 283 em EcA2 (proveniente do monômero adjacente) e Glu 63 em ErA2 (proveniente do mesmo monômero). As representações estão em *cartoon* e os aminoácidos estão representados em *balls and sticks* colorizados por CPK (O = vermelho e N = azul) (www.pymol.org).

De fato, as enzimas EcA2 e ErA2 possuem elevada homologia (48% de identidade e 63% de similaridade) e, ao analisar a árvore filogenética da Classe 1, é possível observar que ambas as enzimas se encontram muito próximas, inseridas dentro do grupo 1 da classe 1 (Figura 19), mesmo com as análises estruturais revelando que a enzima ErA2 possui todos os aminoácidos das tríades catalíticas oriundos do mesmo monômero, enquanto a enzima EcA2

[illegible]

Adicionalmente, através do alinhamento das sequências, foi possível identificar três regiões que apresentaram diferenças de conservação entre os dois grupos de proteínas: Região I – localizada na parte N-terminal das enzimas onde está localizado o resíduo de Glu63 em ErA2; Região II – localizado na porção central das enzimas. Apresenta um resíduo de S nos representantes do grupo de ErA2 ou N na maioria dos representantes de EcA2, que formam

uma rede de interações com os resíduos do sítio ativo; e Região III – se posiciona na porção C-terminal onde está localizado o resíduo de Glu283 de EcA2 (Figura 29 A). Em conjunto, essas três regiões resultaram em 2 diferentes padrões (Figura 29 A).

De 56 sequências de aminoácidos analisadas, 27 apresentaram uma glutamina na região I (Figura 29 A-I) e um resíduo de asparagina na região II (Figura 29 A-II), inclusive o grupo de enzimas de EcA2, na região I. Adicionalmente, 35 sequências apresentaram um resíduo de glutamato conservado na região III (Figura 29 A-III), todas filogeneticamente mais próximas de EcA2. No grupo contendo a enzima ErA2, o resíduo de glutamato é conservado na mesma posição em 11 sequências analisadas (Figura 29 A-I), na região II, 18 sequências apresentaram o resíduo de serina (Figura 29 A-II), no entanto, curiosamente em 21 sequências analisadas, há uma deleção de 2 a 5 resíduos de aminoácidos na região III que contém o Glu283 de EcA2 (Figura 29 A-III), todas filogeneticamente mais próximas a ErA2.

Ao compararmos as estruturas cristalográficas de EcA2 e ErA2, é possível observar que há um *loop* que permite o posicionamento do Glu283 de EcA2 no sítio ativo, realizando uma ponte de hidrogênio com a Tyr25 (Figura 30 B), mas que se encontra encurtado em ErA2 (Figura 30 C), que tem a Tyr29 estabilizada apenas pela interação hidrofóbica com a prolina 123 e uma ponte de hidrogênio com a treonina 15, sendo que estas interações também podem ser observadas em EcA2 (Figura 30 B).

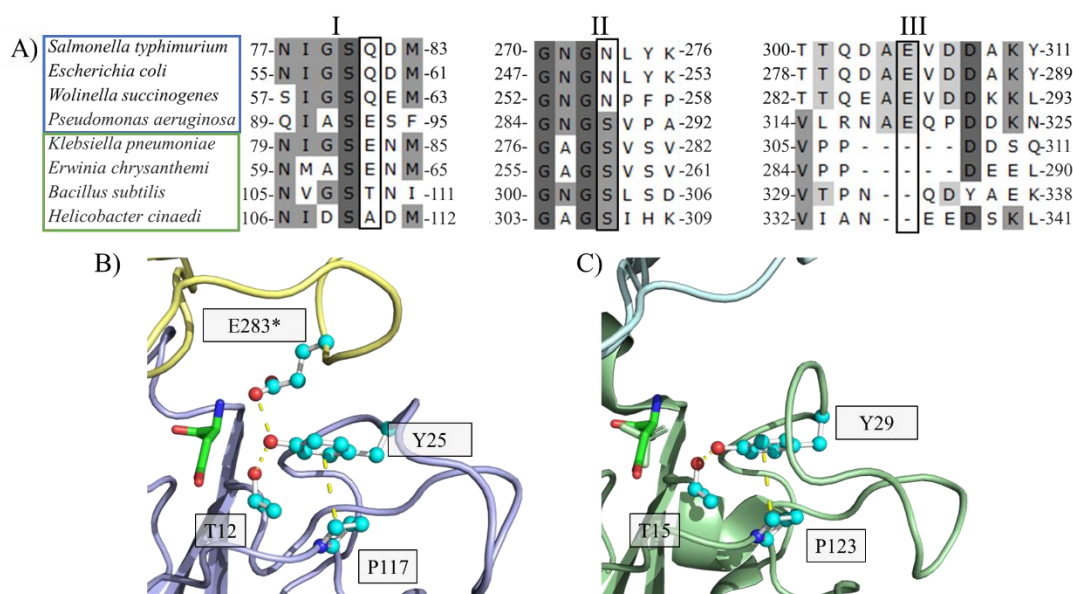


Figura 29: Análises do sítio ativo de ASNases bacterianas. A) Alinhamento de sequências representantes de cada clado: clado azul - ASNases de *S. typhimurium*, *E. coli*, *W. succinogenes* e *P. aeruginosa* representando; e clado verde = *K. pneumoniae*, *E. chrysanthemi*, *B. subtilis* e *H. cinaedi*. Os números I, II e III representam as regiões das sequências analisadas. B) Estrutura cristalográfica de EcA2 (com os monômeros coloridos de diferentes cores: azul e amarelo) com a rede de interações formadas entre E283*, Y25, T12 e P117; e C) Estrutura cristalográfica de ErA2 (com os monômeros coloridos de diferentes cores: ciano e verde) com a rede de interações formadas entre Y29, P123 e T15.

Como podemos perceber, há um padrão mantido na maioria das sequências analisadas: Q59-N250-Q283 em EcA2 e E63-S254-Δ em ErA2. Adicionalmente, estudos envolvendo mutações sítio dirigidas revelaram que estes aminoácidos são capazes de modular a atividade de glutaminase das enzimas (Derst *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2016). A enzima ErA2 possui um K_m sobre Gln de 0,36 mM, enquanto que EcA2 o K_m sobre Gln é de 3,5 mM, 10 × maior que o observado para ErA2 (Derst *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2016), no entanto, quando há a substituição E63Q em ErA2, seu K_m sobre Gln aumenta o K_m em 10× (3,86 mM) e em EcA2, a substituição Q59E também foi possível observar o aumento do K_m (50 mM), e em ambas as mutações, não foram observadas alterações significativas no K_m sobre Asn (Derst *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2016a).

Analisando a estrutura cristalográfica de ErA2, os complexos com Glu e Asp revelaram que o substrato Glu sofre uma alteração espacial de 0,6 Å em direção ao resíduo E63, quando comparado com o substrato Asp (Nguyen *et al.*, 2016a). O resíduo E63 interage diretamente com o grupo amino dos substratos e, de fato, na enzima ErA2^{E63Q}, a cadeia lateral do resíduo Gln contém um átomo de oxigênio que pode atuar como um receptor de ligação H ao grupo amino de Asn ou Gln, porém, o átomo de nitrogênio do grupo amina se apresentou menos favorável para a acomodação do substrato Gln (Nguyen *et al.*, 2016a). Adicionalmente ao mutante E63Q, a substituição do resíduo de Ser 254 por N também foi realizada, ocasionando na inserção de um resíduo maior e de um grupo amina, possível doador de H. A combinação de ambas as substituições (E63Q, S254N) em ErA2, mimetizando a enzima EcA2, ocasionou na redução de atividade de glutaminase de 99%, no entanto, aumentou seu K_m sobre Asn em 4× (Nguyen *et al.*, 2016a).

Ao analisarmos o sítio ativo da estrutura cristalográfica de EcA2, é possível observar uma rede de pontes de H que envolvem todos os resíduos das tríades catalíticas (T89, D90 e K162 e T12, Y25 e E283*) bem como os resíduos Q59 e N250* (Figura 30 A). No entanto, o resíduo E283* ocupa uma região do sítio catalítico onde não há aminoácido com equivalência espacial em ErA2, e seu grupo COOH é posicionado em direção ao grupo N da cadeia principal do substrato, aumentando a nucleofilicidade do sítio ativo (Figura 30 B) e diminuindo o volume do sítio ativo em comparação a ErA2 (Figura 30 C), indicando uma forte influência na seletividade do substrato, uma vez que possui um K_m 10 × maior para Gln (Derst *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2016). Contudo, o posicionamento de E283 ocorre devido a interações com o grupo NH₂ do resíduo Q59 e NH₂ do resíduo N250*

(Figura 30), que seriam perdidas ao realizar a substituição por glutamina e serina, respectivamente.

Adicionalmente, o volume do sítio ativo de ErA2 é muito maior em comparação a EcA2, o que justifica sua maior afinidade por Gln ($K_m = 360\mu\text{M}$) (Nguyen *et al.*, 2016) (Figura 30 D). Na análise do sítio ativo do duplo mutante (ErA2^{E63Q, S254N}) (Figura 30 G) é possível observar uma diminuição de nucleofilicidade (Figura 30 H), o que é ocasionada pela presença dos grupos NH₂ da serina e da glutamina e adicionalmente a ausência do resíduo E283* (de EcA2), o que explica a diminuição da atividade de asparaginase e glutaminase (Nguyen *et al.*, 2016).

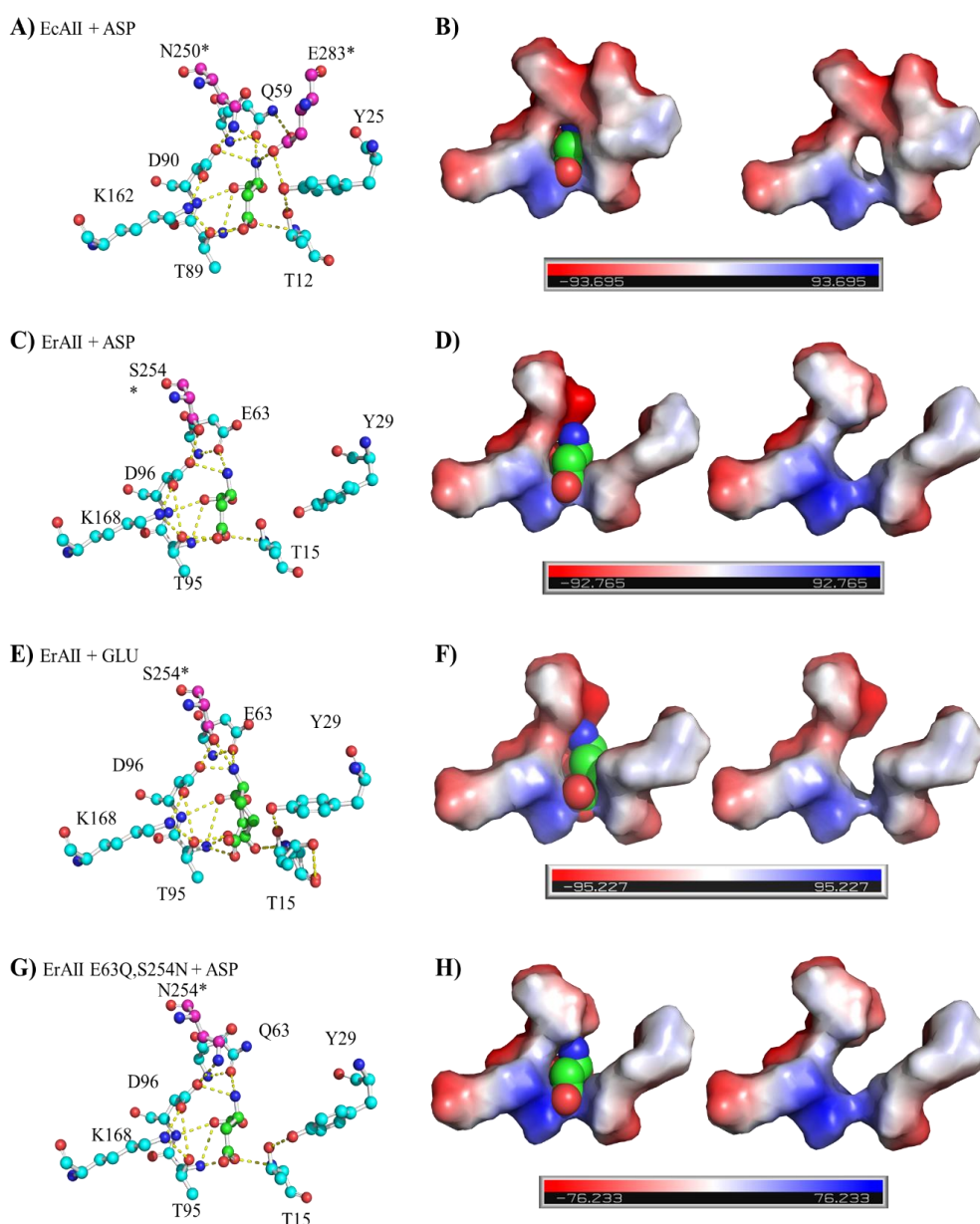


Figura 30: Resíduos do sítio ativo de ASNases bacterianas envolvidos na seletividade do substrato. A) e B) Região do sítio ativo de EcA2 com o ligante Asp (PDB: 3ECA) C) e D) Região do sítio ativo de ErA2 com o

ligante Asp (PDB: 5F52); **E** e **F**) Região do sítio ativo de EcA2 com o ligante Gln (PDB: 5HW0) e **G** e **H**) Região do sítio ativo de EcA2 E63Q, S254N com o ligante Asp (PDB: 5I4B). Os aminoácidos estão representados em *balls and sticks* colorizados por CPK (O = vermelho e N = azul) e o potencial eletrostático representado por tons de azul (+), vermelho (-) e branco (neutro) (www.pymol.org).

Contudo, as análises das mutações sítio dirigidas e das estruturas cristalográficas de EcA2 e ErA2 revelaram que o principal modulador da atividade de glutaminase se deve a presença ou ausência do resíduo E283, localizado na região III (Figura 29A-III) e a deleção natural ocorrida no grupo de sequências de ErA2 provavelmente resultou nas substituições naturais de resíduos chaves (N por S na posição 254*, e Q por E na posição 63) que permitissem a realização da catálise de ambos os substratos, mesmo na ausência de E283*.

De fato, sabe-se que o aminoácido glutamina representa até 50% dos resíduos presentes no soro e sua diminuição pode reduzir a síntese proteica e causar diversos efeitos colaterais (Girão *et al.*, 2016; Ollenschlager *et al.*, 1988; Ramya *et al.*, 2012). Contudo, uma enzima sem atividade de glutaminase pode produzir efeitos satisfatórios em casos de LLA em que as células não produzam ASN sintetase (ASNS⁻), diminuindo os efeitos colaterais do tratamento. Por outro lado, alguns autores ressaltam que atividade de glutaminase é importante para citotoxicidade, principalmente em células tumorais onde o gene da asparagina sintetase (ASNS) continua ativado mesmo após a transformação neoplásica (tipos tumorais ASNS⁺) (Chan *et al.*, 2014; Offman *et al.*, 2011). Contudo, ao analisarmos os 2 grupos obtidos na árvore filogenética das ASNases bacterianas, é possível selecionar potenciais alvos para caracterização funcional e estrutural de ASNases que podem ter afinidade por Gln reduzida, mas atividade de ASNase com K_m na faixa de μM , devido a alta conservação destas sequências com as enzimas EcA2 e ErA2 (ASNases filogeneticamente próximas de EcA2: ASNases de *Shigella sonnei*, *Escherichia marmotae*, *Shiguella boydii*, *Shigella dysenteriae* e *Escherichia fergusonii*, ou até mesmo enzimas com atividade de maior afinidade por Gln, e com K_m na faixa de μM , visando o tratamento de tipos tumorais ASNS⁺ (ASNases filogeneticamente próximas de ErA2: ASNases de *Dickeya solani*, *Pectobacterium caotovorum*, *Pectobacterium pamentieri*, *Serratia plymuthica*, *Klebsiella grimontii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella aerogenes*).

Como mencionado anteriormente, o ideal para se evitar respostas imunes seria a utilização de ASNases endógenas humanas. Neste sentido, já foram identificadas três enzimas de humano com atividade de asparaginase, sendo uma delas pertencente a classe 1 das asparaginase (hsASNase1) (Karamitros; Konrad, 2014). No entanto, ela não apresenta potencial terapêutico uma vez que o K_m reside na faixa de milimolar, muito alto quando

comparada com as enzimas bacterianas ($\sim 7,5 \times 10^{-6}$ M) (Avramis; Tiwari, 2006; Mehta *et al.*, 2014; Nomme *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2014). Uma vez que o sucesso clínico da terapia utilizando ASNase bacteriana é atribuído à baixa quantidade administrada aliada ao esgotamento rápido do aminoácido Asn no plasma, as características cinéticas das ASNases humanas as tornam inviáveis como opção terapêutica (Nomme *et al.*, 2013).

A gpASNase1 possui um K_m sobre Asn na faixa de micromolar e comportamento Michaeliano, e apesar de compartilhar grande homologia com a isoforma de humanos (69,8% de identidade e 88,6% de similaridade), hASNase1 tem um valor de $S_{0,5}$ entre 2,9 e 11,5 mM sobre Asn, apresentando comportamento alostérico com coeficiente de Hill entre 2,5 - 3,9 (Karamitros; Konrad, 2014; Schalk *et al.*, 2014). Entretanto, as razões que levam a estas diferenças permanecem elusivas. Na análise filogenética da árvore das asparaginases da Classe 1, ambas as enzimas compõem o grupo 4. Entretanto, quando construímos uma árvore filogenética utilizando apenas as enzimas de vertebrados (133 sequências), foi possível observar que este grupo de enzimas pode ser dividida em 7 grupos que abrangem os principais grupos de vertebrados: somente primatas, incluindo o hsASNase1; primatas e grandes mamíferos, roedores, incluindo gpASNase1; peixes; anfíbios; aves e répteis (Figura 31).

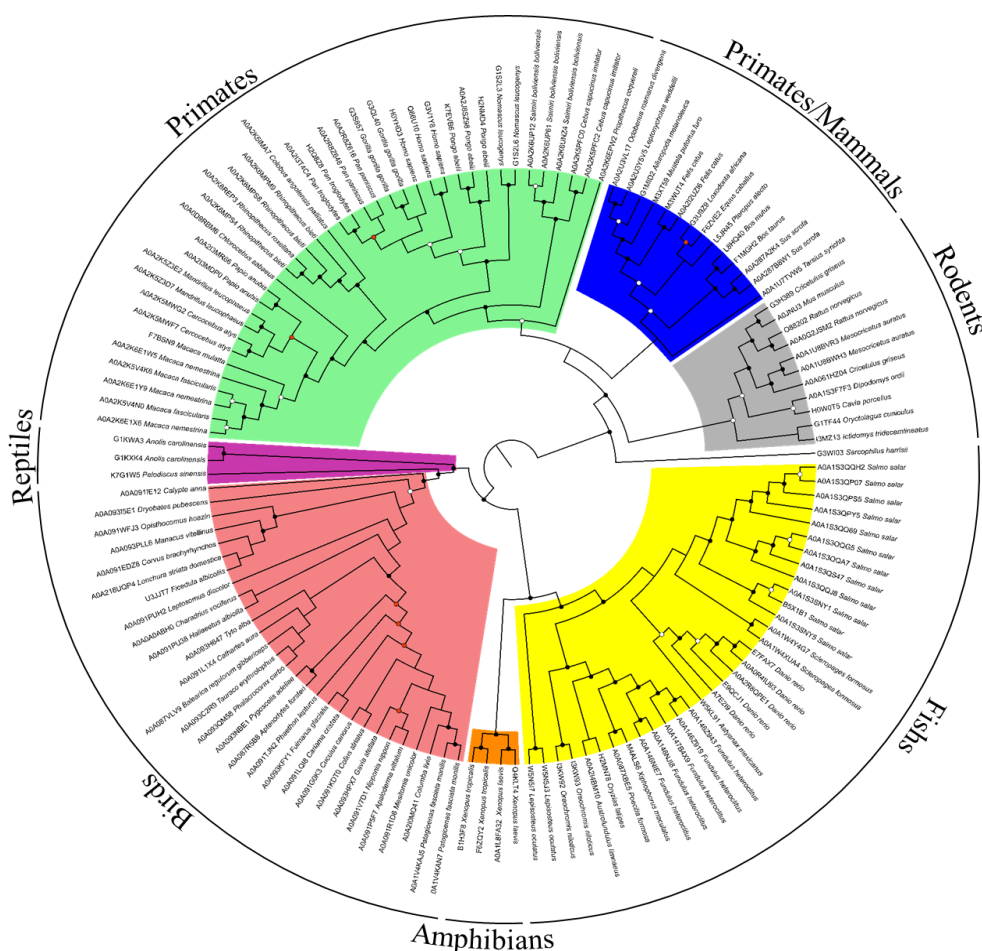


Figura 31: Árvore filogenética de máxima verossimilhança das asparaginases de vertebrados. A árvore foi circularizada e o ponto médio foi enraizado para fins de exibição. Pontos pretos indicam valores de suporte de *bootstrap* (100 réplicas) $\geq 75\%$ e probabilidade posterior bayesiana (PP) $\geq 0,9$; os pontos brancos indicam valores de suporte de *bootstrap* $\geq 75\%$ e PP $\leq 0,9$; e pontos vermelhos indicam valores de suporte de *bootstrap* $\leq 75\%$ e PP $\geq 0,9$. A reconstrução de asparaginases de vertebrados apresentou 7 clados colorizados da seguinte forma: verde: primatas, azuis: primatas/grandes mamíferos, cinza: roedores, amarelos: peixes; laranja: anfíbio; vermelho: pássaros, rosa: répteis.

Estudos recentes utilizando a técnica de *DNA shuffling*, realizando a construções de enzimas quimérica de hASNase1 e gpASNase1, revelaram duas regiões (região 1: 1 – 38 e região 2: 305 – 357) (Figura 32) da enzima gpASNase1 essenciais para a manutenção do baixo K_m da enzima (Rigouin *et al.*, 2017). De fato, a partir do alinhamento de sequências de representantes dos clados de primatas e de roedores, foi possível observar que as regiões 1 e 2 são muito conservadas em primatas, o que não é possível observar no clado de roedores, o qual apresenta mutações pontuais, sugerindo que essas substituições de aminoácidos podem estar relacionadas com as diferenças de K_m observadas entre representantes desses dois clados, tornando o clado de roedores mais interessante do ponto de vista biotecnológico uma vez que há maior variabilidade nos aminoácidos das enzimas quando se analisa as duas regiões relacionadas com o K_m das enzimas (Figura 31 e 32).



Figura 32: Alinhamento das sequências de aminoácidos de ASNases da classe 1 de Primatas e Roedores. Os motivos conservados 1 e 2, e as regiões 1 e 2 que estão relacionadas ao baixo K_m em *C. porcellus*. Resíduos idênticos são destacados em cinza escuro e os resíduos similares em cinza claro. As caixas vermelhas denotam os motivos 1 e 2, as caixas azuis denotam os resíduos que são diferentes comparando Primatas x Roedores e as caixas pretas denotam os resíduos que são diferentes apenas na gpASNase1. Os alinhamentos foram realizados no site da ClustalW (Sievers *et al.*, 2011).

Análises de estruturas utilizando a estrutura cristalográfica de gpASNase1 (PDB 4R8L com ligante Asp e 4R8K, sem ligante), revelam uma enzima tetramérica formada por um

dímero de dímeros íntimos (Figura 33 A), enquanto que as regiões 1 e 2 podem ser localizadas na região do sítio ativo (Figura 33 B vermelho para a região 1 e verde para a região 2). Ambas as regiões estão relacionadas à dinâmica de desenovelamento/enovelamento do *loop* que contém o resíduo de Tyr 308 (região 2) do monômero adjacente, responsável pelo correto posicionamento do resíduo de Thr 19 (região 1) e estabilização do substrato, atuando como uma tampa, fechando o substrato no sítio ativo e permitindo as reações moleculares para a formação do produto (Figura 33 B) (Schalk; Lavie, 2014). Simultaneamente, é possível observar uma torção de folha β na região 1, que permite o posicionamento correto de Tyr 308 (Figura 33 B, círculo preto na região 1 em vermelho). No entanto, em gpASNase1, a região que contém *loop* para permitir o posicionamento correto do resíduo de Tyr possui duas deleções e 4 substituições sendo a maioria delas de aminoácidos de caráter hidrofóbico por polares sem carga (Ala por Thr, Ala por Ser Met por Leu Gly por Asn), o que pode estar envolvido em um mecanismo de funcionamento do *loop* mais produtivo sobre o substrato no sítio ativo (Figura 32 e Figura 33 B) (Rigouin *et al.*, 2017).

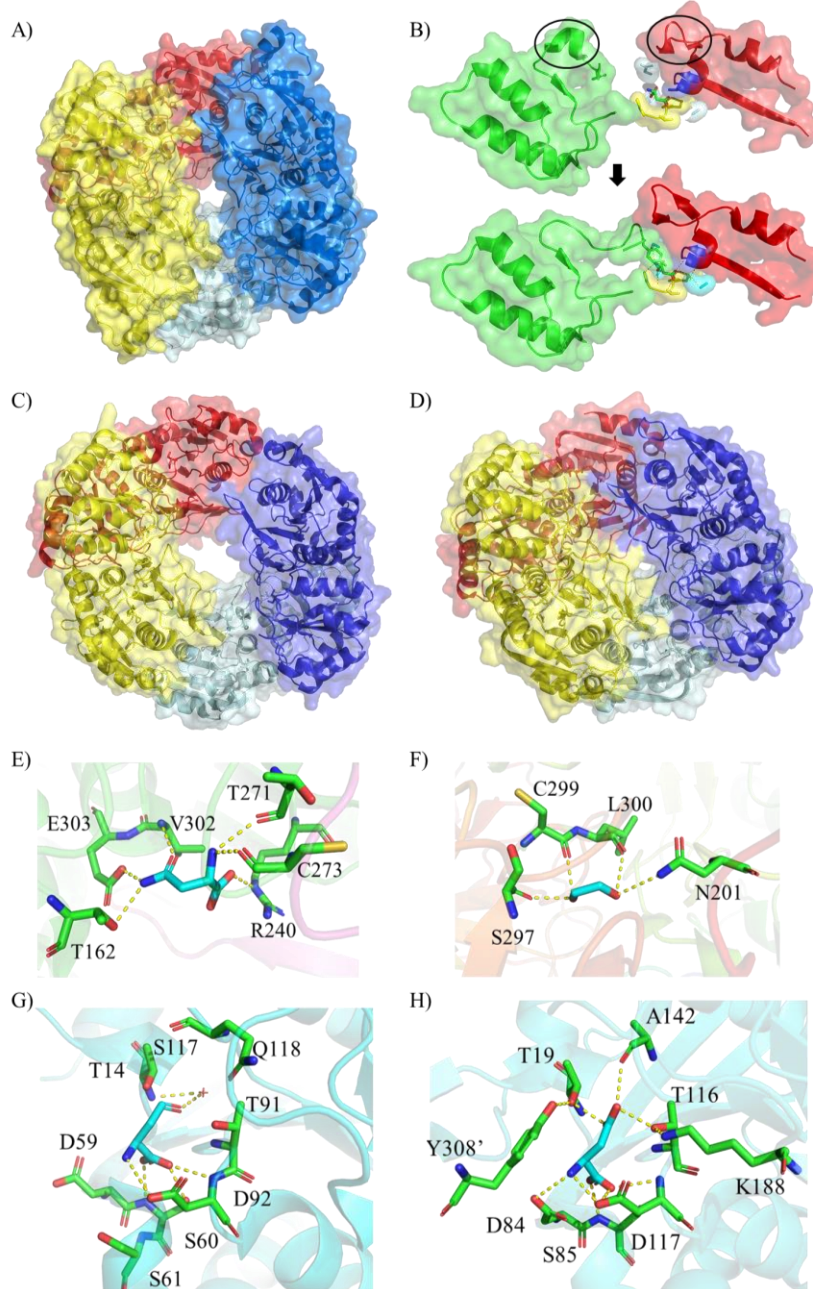


Figura 33: Análise de estruturas de ASNases da classe 1. **A)** O tetrâmero da enzima é composto por quatro monômeros, que estão representados por cores diferentes (código PDB: 4R8K). **B)** Região 1 (vermelho) e 2 (verde) na estrutura cristalográfica antes da ligação com o substrato (código PDB: 4R8K), e os círculos pretos indicam as estruturas secundárias flexíveis e após a ligação com o substrato (código PDB: 4R8L). **C)** O tetrâmero de enzima sem ligante é composto de quatro monômeros, que são representados por cores diferentes (código PDB: 2P2D). **D)** O tetrâmero da enzima com ligante (ASP) é composto por quatro monômeros em uma conformação mais compacta, que são representados por cores diferentes (código PDB: 2HIM). **E)** Análise do sítio alostérico de EcA1. **F)** Uma molécula de ligante (etilenoglicol) apresentada em todos os monômeros da enzima asparaginase de *C. porcellus* na mesma posição que o sítio alostérico de EcA1. Análises do sítio ativo da enzima ASNase 1 de *E. coli* (**G**) e de *C. porcellus* (**H**). Os aminoácidos dos sítios alostérico e catalítico são representados por *sticks*, enquanto C = verde, N = azul, O = vermelho e o ligante (ASP ou etilenoglicol) C = ciano.

Além disso, as enzimas de *Ictidomys tridecemlineatus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Dipodomys ordii*, incluindo gpASNase1, apresentaram algumas substituições nas regiões 1 e 2, que poderiam afetar a dinâmica do *loop*, em comparação com as enzimas da classe 1 de

primatas (Figura 31 e 32), embora, apenas gpASNase1 já foi caracterizada (Schalk *et al.*, 2014, 2016).

Ao contrário de gpASNase, a enzima homóloga EcA1, de *E. coli*, também presente no grupo 4 da classe 1 das ASNases, assim como a enzima humana, apresenta comportamento alostérico e o $S_{0.5}$ varia entre 0,4 e 1,2 mM com o coeficiente de Hill entre 2,6 - 3,5 (Karamitros; Konrad, 2014; Yun *et al.* 2007). O comportamento alostérico de EcA1 pode ser suportado pela estrutura cristalográfica, uma vez que a estrutura quaternária tem uma reorganização significativa (r.m.s.d. = 4,6 Å) após a ligação à asparagina (Figura 33 C e D). Além disso, é possível observar um sítio alostérico na estrutura cristalográfica com o substrato Asp (Figura 33 E) (Yun *et al.*, 2007). Apesar do fato de gpASNase ter comportamento Michaeliano e apenas uma reorganização estrutural local do *loop* na região 2 (rmsd = 2,05 Å), que não está presente em EcA1, curiosamente, quando analisamos ambas as estruturas cristalográficas sobrepostas, observamos uma molécula de ligante (etilenoglicol) presente em todos os monômeros da enzima asparaginase de *C. porcellus* (Figura 33F), que poderia mimetizar a molécula de asparagina, revelando um vestígio evolutivo do sítio alostérico na estrutura tridimensional. Adicionalmente, o sítio catalítico apresentou poucas diferenças: uma substituição de uma alanina por uma serina na posição 117 e o resíduo de tirosina 308 do monômero adjacente de gpASNase presente em EcA1, no entanto, um resíduo de asparagina 246 do monômero adjacente tem uma ligação de hidrogênio com o Nδ2 do substrato (Figura 33 G e H).

Além do fato de as ASNases do grupo 4 da classe 1 apresentarem diferenças funcionais e estruturais entre seus representantes, as enzimas apresentaram semelhanças evolutivas. No entanto, alguns representantes estavam muito bem caracterizados, ex. gpASNase1, e a reconstrução da árvore filogenética revelou que o grupo de asparaginases de roedores podem possuir enzimas com maior variabilidade de sequências de aminoácidos, com potencial características, como comportamento Michaeliano e a presença de um *loop* participante da catálise mais flexível, e podem ser importantes para a escolha de uma de ASNase alternativa para o tratamento de LLA, por exemplo, ASNase de *Dipodomys ordii*. No entanto, a razão de gpASNase1 possuir uma asparaginase com características que tornam o K_m da enzima na ordem de μM não é clara, pois baixos níveis de aminoácidos não essenciais, incluindo Asn, podem ser tóxicos para células de mamíferos (*H. sapiens*) (Kilberg *et al.*, 2005) o que não é verdade para micro-organismos de vida livre que necessitam de N para a síntese de compostos nitrogenados, o que parece se tratar de uma adaptação evolutiva rara.

Nesta etapa do trabalho, avaliamos características funcionais, estruturais e filogenéticas de enzimas que possuem atividade de ASNase, sendo possível classificá-las em: classe 1, classe 2 e classe 3. De modo geral, foi possível observar que, apesar de grande similaridade estrutural entre as enzimas de cada classe, há grande diversidade funcional assim como peculiaridades estruturais. Contudo, as análises resultaram numa classificação mais apropriada, do ponto de vista da nomenclatura, e também do ponto de vista biotecnológico, uma vez que foi possível selecionar enzimas potenciais para caracterização, visando o desenvolvimento de biofármacos alternativos para utilização no tratamento de LLA.

5. Considerações finais

Neste trabalho, obtivemos enzimas recombinantes que apresentaram grau oligomérico único não descrito para outras ASNases e baixa massa molar denominada de ASNaseM. Cabe salientar que a obtenção da enzima monomérica só foi possível quando utilizada linhagens capazes de permitir a formação de dissulfetos, bem como a exclusão da cauda de histidinas. Para a caracterização da enzima foram efetuados estudos estruturais abrangendo experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular e cromatografia de exclusão molecular, construção de modelo teórico e análises computacionais. Também foram avaliadas as atividades enzimáticas de asparaginase (a qual foi significativa) e de glutaminase (ausente). Ainda, foram realizadas mutações sítio dirigidas visando conferir a ASNaseM a atividade de GLNase. Nossos resultados revelaram que as enzimas mutadas não apresentaram ganho de atividade de GLNase, o que indica que apesar das semelhanças existentes com as enzimas bacterianas o ganho de atividade de glutaminase é um fenômeno complexo e necessita de investigações adicionais, que poderão ser executadas em projetos posteriores. Contudo, as análises estruturais e funcionais de ASNaseM revelou uma enzima com características distintas de todas já descritas na literatura, sugerindo uma maior variabilidade de asparaginases.

Também realizamos análises computacionais envolvendo sequências primárias de ASNases, em conjunto com a avaliação de estruturas tridimensionais presentes no *protein data bank*, para entender aspectos evolutivos e propor uma classificação criteriosa de ASNases, a qual revelou grande diversidade funcional, mas uma forte conservação da estrutura terciária e na maioria dos casos, quaternária. De fato, os estudos conduzidos no âmbito desta tese foram muito mais abrangentes que estudos anteriores que utilizaram pequeno número de sequências e estruturas cristalográficas (Borek; Jaskólski, 2001; Dwivedi; Mishra, 2014).

Foram avaliados aspectos evolutivos que revelam enzimas de espécies de bactérias similares as enzimas bacterianas que apresentam baixo K_m sobre Asn, sendo que os resultados evolutivos e estruturais indicam quais são as asparaginases mais próximas a EcA2 e ErA2, o que podem significar enzimas que podem ter características enzimáticas mais apropriadas para a caracterização de potenciais biofármacos para o tratamento de neoplasias sanguíneas, como elevada atividade ASNase e atividade de GLNase. São exemplos destas ASNases: ASNases filogeneticamente próximas de ErA2 - ASNases de *Dickeya solani*, *Pectobacterium caotovorum*, *Pectobacterium pamentieri*, *Serratia plymuthica*, *Klebsiella grimontii*, *Klebsiella*

pneumoniae e *Klebsiella aerogenes*; e ASNases com afinidade reduzida por Gln e alta atividade de ASNase, que são enzimas filogeneticamente próximas de EcA2 - ASNases de *Shigella sonnei*, *Escherichia marmotae*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae* e *Escherichia fergusonii*. Do mesmo modo, os estudos aqui conduzidos revelaram aspectos singulares na enzima de *C. porcellus* que indicam que enzimas de roedores podem possuir características mais apropriadas para utilização como biofármacos, como: ASNases de *Ictidomys tridecemlineatus*, *Oryctolagus cuniculus* e *Dipodomys ordii*.

6. Perspectivas

- 1) Determinação da especificidade citotóxica de ASNaseM sobre diferentes células tumorais de LLA.
- 2) Avaliação da exclusão da cauda N-terminal sobre a estrutura e função de ASNaseM
- 3) Determinação da estrutura de ASNaseM (continuação do trabalho iniciado neste doutorado no LNLS e extendido no BEPE realizado no King's College de Londres sob supervisão do Prof. Dr. Paul F. Long e em andamento com a colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcio V. B. Dias do ICB-USP-SP).
- 4) Caracterização funcional e estrutural de enzimas que apresentaram características filogenéticas e estruturais similares as de EcA2, ErA2 ou gpASNase1.

7 Referências Bibliográficas

- Aghaiypour, K. *et al.* Do bacterial L-asparaginases utilize a catalytic triad Thr-Tyr-Glu? **Biochimica et biophysica acta**, v. 1550, n. 2, p. 117–28, 17 dez. 2001.
- Ajewole, E. *et al.* Structural basis of potassium activation in plant asparaginases. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 8, p. 1528–1539, abr. 2018.
- Akash, M. S. H. *et al.* Development of therapeutic proteins: Advances and challenges. **Turkish Journal of Biology**, v. 39, n. 3, p. 343–358, 2015.
- Ali, U. *et al.* L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 199–210, jan. 2016.
- Anishkin, A. *et al.* Catalytic Role of the Substrate Defines Specificity of Therapeutic l - Asparaginase. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 17, p. 2867–2885, ago. 2015.
- Armstrong, J. K. *et al.* Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. **Cancer**, v. 110, n. 1, p. 103–111, 1 jul. 2007.
- Aslanian, A. M. *et al.* Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce l-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 1, p. 321, 1 jul. 2001.
- Aslantürk, Ö. S. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: **Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World**. [s.l.] InTech, 2018. v. 2p. 64.
- Asselin, B. L. *et al.* Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 11, n. 9, p. 1780–1786, set. 1993.
- Atkins, C. A. *et al.* Asparagine Metabolism--Key to the Nitrogen Nutrition of Developing Legume Seeds. **Plant Physiology**, v. 56, n. 6, p. 807–812, 1975.
- Ausubel, F. M. M. *et al.* **Current protocols in molecular biology**. John Wiley ed. New

York: [s.n.].

Avramis, V. I. Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance. **Anticancer research**, v. 32, n. 7, p. 2423–2437, 2012.

Avramis, V. I.; Panosyan, E. H. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationships of Asparaginase Formulations. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 4, p. 367–393, jan. 2005.

Avramis, V. I.; Tiwari, P. N. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **International journal of nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 241–54, jan. 2006.

Balan, S. *et al.* Site-Specific PEGylation of Protein Disulfide Bonds Using a Three-Carbon Bridge. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 61–76, jan. 2007.

Balcao, V. M. *et al.* Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 3, p. 537–542, 1 jun. 2001.

Balendiran, G. Fibrates in the Chemical Action of Daunorubicin. **Current Cancer Drug Targets**, v. 9, n. 3, p. 366–369, 1 maio 2009.

Barba, P. *et al.* Asparaginase use for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 148, n. 5, p. 225–231, mar. 2017.

Belviso, S. *et al.* The human asparaginase enzyme (ASPG) inhibits growth in leukemic cells. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0178174, 24 maio 2017.

Berman, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

Bilmin, K. *et al.* Original article Influence of serum and albumin on the in vitro anandamide cytotoxicity toward C6 glioma cells assessed by the MTT cell viability assay: implications for the methodology of the MTT tests. **Folia Neuropathologica**, v. 1, n. 1, p. 44–50, 2013.

Borek, D.; Jaskólski, M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. **Acta biochimica Polonica**, v. 48, n. 4, p. 893–902, 2001.

Brown, G. *et al.* Functional and Structural Characterization of Four Glutaminases from

Escherichia coli and *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, v. 47, n. 21, p. 5724–5735, maio 2008.

Bruneau, L. *et al.* Co-occurrence of both L-asparaginase subtypes in *Arabidopsis*: At3g16150 encodes a K⁺-dependent L-asparaginase. **Planta**, v. 224, n. 3, p. 668–679, 2006.

Bush, L. A. *et al.* A novel asparaginase-like protein is a sperm autoantigen in rats. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 2, p. 233–247, 2002.

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

Cantor, J. R. *et al.* The Human Asparaginase-like Protein 1 hASRGL1 Is an Ntn Hydrolase with β -Aspartyl Peptidase Activity. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 11026–11031, 24 nov. 2009.

Carta, D.; Ferlin, M. An Overview on 2-arylquinolin-4(1H)-ones and Related Structures as Tubulin Polymerisation Inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 20, p. 2322–2345, 12 dez. 2014.

Chan, W. K. *et al.* The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. **Blood**, v. 123, n. 23, p. 3596–3606, 5 jun. 2014.

Chen, J.-M. *et al.* Cloning, Isolation, and Characterization of Mammalian Legumain, an Asparaginy Endopeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 12, p. 8090–8098, 21 mar. 1997.

Cho, K. *et al.* Application of a non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters. **Analytical Biochemistry**, v. 492, n. January, p. 8–12, 2015.

Clamp, M. *et al.* The Jalview Java alignment editor. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 20, n. 3, p. 426–7, 12 fev. 2004.

Colvin, O. M. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 5, p. 555–560, 1999.

Cortijo-Cascajares, S. *et al.* Review of hypersensitivity reactions to antineoplastic agents. **Farmacia hospitalaria**, v. 36, n. 3, p. 148–58, 2012.

Costa, I. M. *et al.* Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an

allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36239, 8 dez. 2016.

Couturier, M. *et al.* Cerebral venous thrombosis in adult patients with acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma during induction chemotherapy with L-asparaginase: The GRAALL experience. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 11, p. 986–991, nov. 2015.

Crowther, D. L-asparaginase and human malignant disease. **Nature**, v. 229, n. 5281, p. 168–71, 15 jan. 1971.

Darriba, D. *et al.* ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, v. 27, n. 8, p. 1164–1165, 2017.

Derst, C. Probing the role of threonine and serine residues of *E. coli* asparaginase II by site-specific mutagenesis. **Protein engineering**, v. 5, n. 8, p. 785–9, dez. 1992.

Derst, C. *et al.* Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 9, n. 10, p. 2009–17, out. 2000.

Douer, D. *et al.* Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction in adults aged 55 years or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2744–50, 1 abr. 2007.

Douer, D. Is asparaginase a critical component in the treatment of acute lymphoblastic leukemia? **Best practice & research. Clinical haematology**, v. 21, n. 4, p. 647–58, dez. 2008.

Dufour, E. *et al.* Pancreatic tumor sensitivity to plasma L-asparagine starvation. **Pancreas**, v. 41, n. 6, p. 940–8, ago. 2012.

Dunlop, P. C. *et al.* Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of biological chemistry**, v. 253, n. 4, p. 1297–304, 25 fev. 1978.

Dunlop, P. C. *et al.* Reactions of Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 4, p. 1542–1546, 1980.

Dunlop, P. C.; Roon, R. J. L-Asparaginase of *Saccharomyces cerevisiae*: an extracellular Enzyme. **Journal of bacteriology**, v. 122, n. 3, p. 1017–24, jun. 1975.

Dwivedi, V. D.; Mishra, S. K. In silico analysis of L-asparaginase from different source organisms. **Interdisciplinary sciences, computational life sciences**, v. 6, n. 2, p. 93–9, jun. 2014.

El-Naggar, N. E.-A. *et al.* Purification, characterization, cytotoxicity and anticancer activities of L-asparaginase, anti-colon cancer protein, from the newly isolated alkaliphilic *Streptomyces fradiae* NEAE-82. **Scientific reports**, v. 6, n. March, p. 32926, 2016.

Ellem, K. A. *et al.* The dependence of DNA and RNA synthesis on protein synthesis in asparaginase-treated lymphoma cells. **Cancer research**, v. 30, n. 2, p. 515–27, fev. 1970.

Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126–32, dez. 2004.

Enomaa, N. *et al.* Human aspartylglucosaminidase. A biochemical and immunocytochemical characterization of the enzyme in normal and aspartylglucosaminuria fibroblasts. **The Biochemical journal**, v. 286, p. 613–8, 1 set. 1992.

Ertel, A. *et al.* Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. **Molecular cancer**, v. 5, n. 1, p. 55, 2 nov. 2006.

Flohé, L. *et al.* Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 397, n. 2, p. 324–35, 15 jan. 2002.

Ghaffari, P. *et al.* Cancer Metabolism: A Modeling Perspective. **Frontiers in physiology**, v. 6, n. December, p. 382, 16 dez. 2015.

Girão, L. F. DE C. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II, a potential antileukemic drug: Purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 118–125, abr. 2016.

Gong, S. S.; Basilico, C. A mammalian temperature-sensitive mutation affecting G1 progression results from a single amino acid substitution in asparagine synthetase. **Nucleic**

acids research, v. 18, n. 12, p. 3509–13, 25 jun. 1990.

Grover, C. E.; Chibnall, A. C. The Enzymic Deamidation of Asparagine in the Higher Plants. **The Biochemical journal**, v. 21, n. 4, p. 857–68, 1927.

Hejazi, M. *et al.* Isoaspartyl dipeptidase activity of plant-type asparaginases. **Biochemical Journal**, v. 364, n. 1, p. 129–136, 15 maio 2002.

Hsieh, J. J. D. *et al.* Taspase1: A threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. **Cell**, v. 115, n. 3, p. 293–303, 2003.

Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754–755, 1 ago. 2001.

Huh, W. K. *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 686–91, 16 out. 2003.

Iacobucci, I.; Mullighan, C. G. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 35, n. 9, p. 975–983, 20 mar. 2017.

INCA. Remédio (?) amargo. **Rede Câncer**, v. 29, p. 30–32, 2015.

Instituto Nacional do Câncer – INCA 2018.

Jarrar, M. *et al.* Asparagine depletion after pegylated *E. coli* asparaginase treatment and induction outcome in children with acute lymphoblastic leukemia in first bone marrow relapse: A Children's Oncology Group study (CCG-1941). **Pediatric Blood & Cancer**, v. 47, n. 2, p. 141–146, ago. 2006.

Jaskólski, M. *et al.* Structures of two highly homologous bacterial L-asparaginases: a case of enantiomorphic space groups. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 57, n. 3, p. 369–377, 1 mar. 2001.

Jia, M. *et al.* Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 39, p. 9428–9434, 2013.

Jones, G. E. Genetic and physiological relationships between L-asparaginase I and

asparaginase II in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 130, n. 1, p. 128–30, abr. 1977.

Jones, P. *et al.* Sequence analysis InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 2014.

Kafkewitz, D.; Bendich, A. Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function. **The American journal of clinical nutrition**, v. 37, n. 6, p. 1025–30, jun. 1983.

Karamitros, C. S.; Konrad, M. Human 60-kDa lysophospholipase contains an N-terminal L-asparaginase domain that is allosterically regulated by L-asparagine. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 19, p. 12962–75, 9 maio 2014.

Katoh, K.; Standley, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability Article Fast Track. v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

Kavitha, A.; Vijayalakshmi, M. A study on L-asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL_113. **TheScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 160434, jan. 2012.

Kearse, M. *et al.* Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

Kelly, S. M. *et al.* How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1751, n. 2, p. 119–39, 10 ago. 2005.

Khan, J. A. *et al.* Crystal structure of human taspase1, a crucial protease regulating the function of MLL. **Structure**, v. 13, n. 10, p. 1443–1452, 2005.

Kidd, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **The Journal of experimental medicine**, v. 98, n. 6, p. 565–82, dez. 1953.

Kilberg, M. S. *et al.* Nutritional Control of Gene Expression: How Mammalian Cells Respond to Amino Acid Limitation. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 59–85, 21 ago. 2005.

Kloos, R. Q. H. *et al.* A cost analysis of individualized asparaginase treatment in pediatric

acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 64, n. 12, 2017.

Kravchenko, O. V. *et al.* Three-dimensional structures of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* complexed with aspartate and glutamate. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 64, n. 3, p. 248–256, 1 mar. 2008.

Labrou, N. E. *et al.* Structure-function relationships and clinical applications of L-asparaginases. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 20, p. 2183–95, 2010.

Lanvers-Kaminsky, C. Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 79, n. 3, p. 439–450, mar. 2017.

Larget, B.; Simon, D. L. Markov Chasin Monte Carlo Algorithms for the Bayesian Analysis of Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 6, p. 750–759, 1 jun. 1999.

Larson, R. A. **PDQ Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment**. Disponível em: <<http://www.upToDate.com/contents/acute-lymphoblastic-leukemia-all-treatment-in-adults-beyond-the-basics?view=print#>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

Le, S. Q.; Gascuel, O. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1307–1320, 2008.

Lebedeva, Z. I.; Berezov, T. T. An improved method of purification and properties of glutamine asparaginase from *Pseudomonas aurantiaca* 548. **Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny**, v. 124, n. 11, p. 598–600, nov. 1997.

Li, W. *et al.* Uncoupling Intramolecular Processing and Substrate Hydrolysis in the N-Terminal Nucleophile Hydrolase hASRGL1 by Circular Permutation. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 11, p. 1840–1847, 16 nov. 2012.

Li, W. *et al.* Intramolecular Cleavage of the hASRGL1 Homodimer Occurs in Two Stages. **Biochemistry**, v. 55, n. 6, p. 960–969, 2016.

Lopes, A. M. *et al.* Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 82–99, fev. 2017.

Lubkowski, J. *et al.* Crystal structure and amino acid sequence of *Wolinella succinogenes* L-

asparaginase. **European journal of biochemistry**, v. 241, n. 1, p. 201–7, 1 out. 1996.

Maggi, M. *et al.* Engineering of *Helicobacter pylori* L-Asparaginase: Characterization of Two Functionally Distinct Groups of Mutants. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. e0117025, 2015.

Makino, M. *et al.* Studies on Enzymes Acting on Glycopeptides. **The Journal of Biochemistry**, v. 63, n. 2, p. 186–192, fev. 1968.

Malouf, C.; Ottersbach, K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 3, p. 417–446, 17 fev. 2017.

Man, L. M. *et al.* New Therapeutic Strategies in Acute Lymphocytic Leukemia. **Current hematologic malignancy reports**, v. 12, n. 3, p. 197–206, 2017.

Manna, S. *et al.* Purification, characterization and antitumor activity of l-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405. **Current Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 291–298, 1995.

McCredie, K. B. *et al.* L-asparaginase for the treatment of cancer. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 23, n. 4, p. 220–7, 1953.

Meena, B. *et al.* L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of l-asparaginase gene. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12404, 24 dez. 2015.

Mehta, R. K. *et al.* Mutations in subunit interface and B-cell epitopes improve antileukemic activities of escherichia coli asparaginase-II: evaluation of immunogenicity in mice. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 6, p. 3555–70, 7 fev. 2014.

Menniti, M. *et al.* 60kDa lysophospholipase, a new Sgk1 molecular partner involved in the regulation of ENaC. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 4–5, p. 587–596, 2010.

Mezentsev, Y. V. *et al.* Specificity of molecular recognition in oligomerization of bacterial L-asparaginases. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 124–134, 24 jun. 2011.

Michalska, K. *et al.* Crystal structure of isoaspartyl aminopeptidase in complex with L-aspartate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 31, p. 28484–28491, 2005.

Michalska, K. *et al.* The Mechanism of Autocatalytic Activation of Plant-type L-

Asparaginases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 19, p. 13388–13397, 9 maio 2008.

Michalska, K.; Jaskolski, M. Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. **Acta biochimica Polonica**, v. 53, n. 4, p. 627–40, jan. 2006.

Miller, H. K. *et al.* Amino acid levels following L-asparagine amidohydrolase (EC.3.5.1.1) therapy. **Cancer research**, v. 29, n. 1, p. 183–7, jan. 1969.

Mononen, I. *et al.* Aspartylglycosaminuria: protein chemistry and molecular biology of the most common lysosomal storage disorder of glycoprotein degradation. **FASEB journal**, v. 7, n. 13, p. 1247–56, out. 1993.

Moreno-Enriquez, A. *et al.* Biochemical characterization of recombinant L-asparaginase (AnsA) from *Rhizobium etli*, a member of an increasing rhizobial-type family of L-asparaginases. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 292–300, 28 mar. 2012.

Netto, L. E. S. *et al.* Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. **Free radical research**, v. 50, n. 2, p. 206–45, 2016.

Nguyen, H. A. *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 Research**, v. 78, n. 6, p. 1549–1560, 2018.

Nguyen, H. A. *et al.* The differential ability of asparagine and glutamine in promoting the closed/active enzyme conformation rationalizes the *Wolinella succinogenes* L-asparaginase substrate specificity. **Scientific reports**, v. 7, n. January, p. 41643, 31 jan. 2017.

Nguyen, H. A. *et al.* A. Design and Characterization of *Erwinia chrysanthemi* l-Asparaginase Variants with Diminished L-glutaminase Activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 34, p. 17664–76, 2016a.

Nguyen, H. A. *et al.* Structural Insight into Substrate Selectivity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 55, n. 8, p. 1246–53, 1 mar. 2016b.

Niizuma, H. *et al.* Taspase 1: A protease with many biological surprises Taspase 1 Cleaves MLL and TFIIA Families of Nuclear Proteins to Orchestrate Various Genetic Programs. n.

December, p. 3–5, 2015.

Nishio, M. *et al.* CH– π hydrogen bonds in biological macromolecules. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, n. 25, p. 12648–12683, 2014.

Nomme, J. *et al.* Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: Insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. **Biochemistry**, v. 51, n. 34, p. 6816–6826, 2013.

Nomme, J. *et al.* Elucidation of the specific function of the conserved threonine triad responsible for human l-Asparaginase autocleavage and substrate hydrolysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 13, p. 2471–2485, 2014.

Offman, M. N. *et al.* Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. **Blood**, v. 117, n. 5, p. 1614–21, 3 fev. 2011.

Oinonen, C. *et al.* Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. **Nature structural biology**, v. 2, n. 12, p. 1102–8, dez. 1995.

Ollenschläger, G. *et al.* Asparaginase-induced derangements of glutamine metabolism: the pathogenetic basis for some drug-related side-effects. **European journal of clinical investigation**, v. 18, n. 5, p. 512–6, out. 1988.

Pal Roy, M. *et al.* Isolation, purification and characterization of an extracellular L-asparaginase produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* strain MG1 from the water bodies of Moraghat forest, Jalpaiguri, India. **The Journal of General and Applied Microbiology**, 2018.

Panosyan, E. H. *et al.* Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 26, n. 4, p. 217–26, abr. 2004.

Panosyan, E. H. *et al.* Asparagine depletion potentiates the cytotoxic effect of chemotherapy against brain tumors. **Molecular cancer research: MCR**, v. 12, n. 5, p. 694–702, maio 2014.

Papageorgiou, A. C. *et al.* Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase. **The FEBS journal**, v. 275, n. 17, p. 4306–16, set. 2008.

Parmentier, J. H. *et al.* Glutaminase activity determines cytotoxicity of l-asparaginases on most leukemia cell lines. **Leukemia Research**, v. 39, n. 7, p. 757–762, jul. 2015.

Patel, N. *et al.* A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug l-asparaginase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 1964–1973, 8 jun. 2009.

Peterson, R. E.; Ciegler, A. L-asparaginase production by various bacteria. **Applied microbiology**, v. 17, n. 6, p. 929–30, jun. 1969.

Pieters, R. *et al.* L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia asparaginase*. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–49, 15 jan. 2011.

Pui, C.H.; Evans, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 354, n. 2, p. 166–78, 12 jan. 2006.

Pui, C. *et al.* How to solve the problem of hypersensitivity to asparaginase? **Pediatric blood & cancer**, v. 65, n. 3, p. 19–20, mar. 2018.

Qian, X. *et al.* Dual Role for an Aspartic Acid in Glycosylasparaginase Autoproteolysis. **Structure**, v. 11, n. 8, p. 997–1003, ago. 2003.

Quevillon, E. *et al.* InterProScan: protein domains identifier. **Nucleic acids research**, v. 33, n. Web Server issue, p. W116-20, 1 jul. 2005.

Raetz, E. A; Salzer, W. L. Tolerability and efficacy of L-asparaginase therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 32, n. 7, p. 554–63, out. 2010.

Raha, S. K. *et al.* Purification and properties of an L-asparaginase from *Cylindrocarpon obtusisporum* MB-10. **Biochemistry International**, v. 21, n. 6, p. 987–1000, 1990.

Rambaut, A. **FigTree version 1.3.1**, 2009.

Ramya, L. N. *et al.* L-Asparaginase as potent anti-leukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 167, n. 8, p. 2144–59, ago. 2012.

Ranjit, D. K. *et al.* *Staphylococcus aureus* CidA and LrgA proteins exhibit holin-like

properties. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p.2468-76, 2011.

Rau, R. E. *et al.* Outcome of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma with hypersensitivity to pegaspargase treated with PEGylated Erwinia asparaginase, pegcrisantaspase: A report from the Children's Oncology Group. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 65, n. 3, p. e26873, mar. 2018.

Reeves, J. H. Heterogeneity in the Substitution Process of Amino Acid Sites of Proteins Coded for by Mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v. 35, p. 17–31, 1992.

Riccardi, R. *et al.* L-asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans. **Cancer research**, v. 41, n. 11 Pt 1, p. 4554–8, nov. 1981.

Richter, R. *et al.* Cyanophycinase, a peptidase degrading the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin): molecular cloning of the gene of *Synechocystis* sp. PCC 6803, expression in *Escherichia coli*, and biochemical characterization of the purified enzyme. **European journal of biochemistry**, v. 263, n. 1, p. 163–9, jul. 1999.

Rigouin, C. *et al.* Discovery of human-like L-asparaginases with potential clinical use by directed evolution. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

Riss, T. L. *et al.* **Cell Viability Assays**. [s.l: s.n.]. v. 114

Rizzari, C. *et al.* Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current opinion in oncology**, v. 25 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S1-9, mar. 2013.

Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**. v.5, p. 172, 2014.

Rosendahl, M. S. *et al.* A long-acting, highly potent interferon alpha-2 conjugate created using site-specific PEGylation. **Bioconjugate chemistry**, v. 16, n. 1, p. 200–7, 2005.

Rytting, M. E. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. **Cancer**, v. 123, n. 13, p. 2398–2403, 1 jul. 2017.

Sanches, M. *et al.* Structural comparison of *Escherichia coli* L-asparaginase in two

monoclinic space groups. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 59, n. Pt 3, p. 416–22, mar. 2003.

Sanches, M. *et al.* Structure, Substrate Complexation and Reaction Mechanism of Bacterial Asparaginases. **Current Chemical Biology**, v. 1, n. 1, p. 75–86, 1 jan. 2007.

Santos, J. H. P. M. *et al.* Heterologous expression and purification of active L-asparaginase I of *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* host. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 2, p. 416–424, mar. 2017.

Schalk, A. M. *et al.* Identification and Structural Analysis of an l-Asparaginase Enzyme from Guinea Pig with Putative Tumor Cell Killing Properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 48, p. 33175–33186, 28 nov. 2014.

Schalk, A. M. *et al.* Experimental data in support of a direct displacement mechanism for type I/II L-asparaginases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 10, p. 5088–5100, 2016.

Schalk, A. M.; Lavie, A. Structural and kinetic characterization of guinea pig l-asparaginase type III. **Biochemistry**, v. 53, n. 14, p. 2318–2328, 2014.

Schmitt, E. *et al.* Structural basis for tRNA-dependent amidotransferase function. **Structure**, v. 13, n. 10, p. 1421–1433, 2005.

Shakambari, G. *et al.* Cloning and expression of L-asparaginase from *Bacillus tequilensis* PV9W and therapeutic efficacy of Solid Lipid Particle formulations against cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

Shrivastava, A. *et al.* Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 100, p. 1–10, abr. 2016.

Sieciechowicz, K. A. *et al.* The metabolism of asparagine in plants. **Phytochemistry**, v. 27, n. 3, p. 663–671, 1988.

Sievers, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 11 out. 2011.

Sodek, L. Distribution and properties of a potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plants. **Plant physiology**, v. 65, p. 22–26, 1980.

Stamatakis, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014.

Steiner, T.; Koellner, G. Hydrogen bonds with pi-acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3D structures. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 535–57, 19 jan. 2001.

Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193–203, 15 dez. 2015.

Story, M. D. *et al.* L-asparaginase kills lymphoma cells by apoptosis. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 129–33, 1993.

Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, n. November, p. A3.B.1-3, 2 nov. 2015.

Stumm, F. O. E V. **Ministério da Saúde apresenta para a indústria lista de produtos prioritários.**

Sugimoto, H. *et al.* Cloning and expression of cDNA encoding rat liver 60-kDa lysophospholipase containing an asparaginase-like region and ankyrin repeat. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 20, p. 12536–42, 15 maio 1998.

Sugimoto, H.; Yamashita, S. Characterization of the transacylase activity of rat liver 60-kDa lysophospholipase-transacylase. Acyl transfer from the sn-2 to the sn-1 position. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1438, n. 2, p. 264–272, 1999.

Swain, A. L. *et al.* Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 4, p. 1474–8, 15 fev. 1993.

Tairum, C. A. *et al.* Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 33133, 15 dez. 2016.

Tairum, C. A. *et al.* Disulfide Biochemistry in 2-Cys Peroxiredoxin: Requirement of Glu50 and Arg146 for the Reduction of Yeast Tsa1 by Thioredoxin. **Journal of Molecular Biology**, v. 424, n. 1–2, p. 28–41, 15 nov. 2012.

Thompson, J. D. *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 24, p. 4876–82, 15 dez. 1997.

Tollersrud, O. K.; Aronson, N. N. Purification and characterization of rat liver glycosylasparaginase. **The Biochemical journal**, v. 260, n. 1, p. 101–8, 15 maio 1989.

Toplak, A. *et al.* Proteolysin, a novel highly thermostable and cosolvent-compatible protease from the thermophilic bacterium *Coprothermobacter proteolyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n18, p. 5625–32, 2013.

Ustwani, O. AL *et al.* Clinical updates in adult acute lymphoblastic leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 99, p. 189–199, mar. 2016.

Verma, N. *et al.* L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. **Critical reviews in biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45–62, 2007.

Verma, S. *et al.* Improvement of stability and enzymatic activity by site-directed mutagenesis of *E. coli* asparaginase II. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1844, n. 7, p. 1219–30, jul. 2014.

Veronese, F. M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. **Biomaterials**, v. 22, n. 5, p. 405–17, mar. 2001.

Villa, P. *et al.* L-asparaginase effects on inhibition of protein synthesis and lowering of the glutamine content in cultured rat hepatocytes. **Toxicology letters**, v. 32, n. 3, p. 235–41, set. 1986.

Voet-van-Vormizeele, J.; Groth, G. High-level expression of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor protein ETR1 in *Escherichia coli* and purification of the recombinant protein. **Protein Expression Purification**. v. 32, p. 89–94, 2003.

Völler, S. *et al.* Pharmacokinetics of recombinant asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 81, n. 2, p. 305–314, 2018.

Wünsch, D. *et al.* Taspase1: A “misunderstood” protease with translational cancer relevance. **Oncogene**, v. 35, n. 26, p. 3351–3364, 2016.

Xuan, J. *et al.* Crystal structure of glycosylasparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*. **Protein Science**, v. 7, n. 3, p. 774–781, mar. 1998.

Yang, Z. Maximum-Likelihood Estimation of Phylogeny from DNA Sequences When Substitution Rates Differ over Sites¹. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 6, p. 1396–1401, 1993.

Yu, M. *et al.* L-asparaginase inhibits invasive and angiogenic activity and induces autophagy in ovarian cancer. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 10, p. 2369–78, out. 2012.

Yun, M. *et al.* Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase I. **Journal of molecular biology**, v. 369, n. 3, p. 794–811, 8 jun. 2007.

Ziemin-Van Der Poel, S. *et al.* Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 23, p. 10735–9, 1991.

Apêndice A

Costa, I. M., Schultz, L., Pedra, B, A. B., Leite, M. S. M., Farsky, S. H. P., Oliveira M. A., Pessoa, A., Monteiro, G. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. Sci. Rep. 2016; 6 (1) 36239.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity

Received: 30 April 2016

Accepted: 12 October 2016

Published: 08 November 2016

Iris Munhoz Costa¹, Leonardo Schultz², Beatriz de Araujo Bianchi Pedra¹, Mariana Silva Moreira Leite¹, Sandra H. P. Farsky³, Marcos Antonio de Oliveira², Adalberto Pessoa¹ & Gisele Monteiro¹

L-asparaginase (L-ASNase) (EC 3.5.1.1) is an important enzyme for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. Currently, the enzyme is obtained from bacteria, *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*. The bacterial enzymes family is subdivided in type I and type II; nevertheless, only type II have been employed in therapeutic proceedings. However, bacterial enzymes are susceptible to induce immune responses, leading to a high incidence of adverse effects compromising the effectiveness of the treatment. Therefore, alternative sources of L-ASNase may be useful to reduce toxicity and enhance efficacy. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has the *ASP1* gene responsible for encoding L-asparaginase 1 (ScASNase1), an enzyme predicted as type II, like bacterial therapeutic isoforms, but it has been poorly studied. Here we characterised ScASNase1 using a recombinant enzyme purified by affinity chromatography. ScASNase1 has specific activity of 196.2 U/mg and allosteric behaviour, like type I enzymes, but with a low $K_{0.5} = 75 \mu\text{M}$ like therapeutic type II. We showed through site-directed mutagenesis that the T64-Y78-T141-K215 residues are involved in catalysis. Furthermore, ScASNase1 showed cytotoxicity for the MOLT-4 leukemic cell lineage. Our data show that ScASNase1 has characteristics described for the two subfamilies of L-asparaginase, types I and II, and may have promising antineoplastic properties.

L-asparaginase amidohydrolase (L-ASNase) (EC 3.5.1.1) catalyses the hydrolysis of L-asparagine (L-Asn) in aspartic acid and ammonia. L-ASNases are classified in three families: the plant-type, the *Rhizobium etili*-type and the bacteria-type. The bacterial family is subdivided into type I and type II¹; type I enzymes are cytosolic, expressed constitutively and have low affinity for L-Asn, resulting in non-therapeutic applications, while type II enzymes are restricted in the periplasmic space, with induced expression during anaerobiosis, have high affinity for L-Asn and present antitumor activity^{2,3}.

L-ASNase type II from *Escherichia coli* (EcASNase2) and *Erwinia chrysanthemi* (EwASNase2), native and PEGylated forms, are used for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia (ALL) due to the fact that leukemic cells need extracellular L-Asn for protein synthesis, and L-ASNase depletes L-Asn and L-glutamine (L-Gln) from serum causing death by starvation and the absence of anti-apoptotic proteins^{4–6}. Interestingly, only leukaemia cells are sensitive to L-ASNase, as they frequently present asparagine synthetase (ASNS) genes that have been silenced by epigenetic mechanisms, while normal blood cells do not^{7,8}.

However, during treatment with bacterial L-ASNases, patients show a high incidence of adverse effects, such as neurotoxicity caused by the hydrolysis of L-Gln, hypersensitivity and allergic reactions that can lead to anaphylactic shock, and the formation of antibody anti-asparaginase^{4,9–12}. Nowadays, new L-ASNases have been identified in eukaryotic sources, in an effort to find new promising biopharmaceuticals with fewer side effects¹³.

¹Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo/SP 05508-000, Brazil. ²Biosciences Institute, São Paulo State University - UNESP, Coastal Campus, São Vicente/SP 11330-900, Brazil. ³Department of Clinical and Toxicological Analysis School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo/SP 05508-000, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.M. (email: smgisele@usp.br)

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* constitutively expresses the gene *ASP1*, producing an intracellular cytoplasmic enzyme L-asparaginase 1 (ScASNase1). However, it has high molecular similarity to bacterial enzymes used in therapy^{14,15} and is classified in the bacterial type II family^{1,16}. In the 1970s, the few studies performed with ScASNase1 demonstrated low activity and affinity to L-Asn^{14,17}. Since then, no studies about this enzyme have been reported.

Therefore, we here describe the structural and biochemical characterization of the recombinant ScASNase1. Our results revealed that ScASNase1 presents allosteric behaviour similar to that of type I enzymes. Using site-directed mutagenesis approach to substitute important residues used in catalysis in bacterial enzymes, which are conserved in ScASNase1, we show that substitutions abrogated the enzyme activity but do not exert significant effects on the secondary structure of the enzyme. Moreover, we have demonstrated that ScASNase1 has antineoplastic potential in the MOLT-4 leukemic cell lineage, similarly to that observed for type II bacterial enzymes.

Results

Determining specific activity, optimum pH, temperature and kinetic parameters of ScASNase1.

The *ASP1* gene from *S. cerevisiae* has 1,146 bp and was obtained by PCR from genomic DNA, then cloned into the expression vector pET15b. The ScASNase1 was expressed in cytosol in the soluble fraction of proteins from the *E. coli* BL21 (DE3) strain. After purification, the enzyme was analysed by SDS–PAGE. The molecular mass of ScASNase1 is 41.4 kDa, and the His-tag addition resulted in a recombinant enzyme of approximately 45 kDa (<http://web.expasy.org/protparam/>). The gel showed a homogenous and pure protein with the expected molecular weight (see supplementary Fig. S1).

Using the purified protein, we determined the specific activity for L-Asn with Nessler's reagent and by coupled assay with NADH oxidation for L-Gln. The specific activity was calculated by the initial velocity of L-Asn or L-Gln hydrolysis as a function of enzyme concentration (Fig. 1A,B). ScASNase1 presented high specific activity for L-Asn of 196.2 ± 5.8 U/mg and low for L-Gln of 0.4 ± 0.02 U/mg; this last represents 0.38% of the L-asparaginase activity, considering the determination of the activity by the same method for both substrates (see supplementary Fig. S2). The pH effect on the optimum activity of the enzyme was measured in the range from 4.0 to 12.0. ScASNase1 was active in the range from pH 5.0 to 11.0, and its optimal activity was at pH 8.6 (Fig. 1C). The optimum temperature was determined by measuring enzyme activity in a temperature range from 20 °C to 65 °C for 20 minutes, and the higher value observed was at 40 °C (Fig. 1D).

The kinetic parameters were determined by coupled assay with NADH oxidation. Different concentrations of L-Asn were used to create a plot of initial velocity as a function of L-Asn concentration; the initial velocity was determined through linear regression. The graph revealed a sigmoidal profile and allosteric behaviour (Fig. 1E) and affinity for the substrate in the μ M range with positive cooperativity, as indicated by the Hill plot (Fig. 1F). The Hill coefficient measures the deviation of the Michaelis–Menten kinetics and describes quantitatively the degree of enzyme cooperativity¹⁸. The kinetic parameters determined are presented in Table 1. Statistical analysis of the kinetic models (Michaelis–Menten and sigmoidal allosteric), using the F-test under the null hypothesis that the enzyme has a Michaelis–Menten kinetic profile, revealed that the best kinetic model for ScASNase1 is the allosteric sigmoidal model with $R^2 = 0.9726$ and $p < 0.001$. The commercial EcASNase2 enzyme used as the control showed michaelian behaviour with $R^2 = 0.9797$ and K_m in the μ M range (Table 1), in agreement with the described in the literature, and specific activity of 224 ± 7 U/mg (see supplementary Fig. S3).

EcASNase2 has recently been described as possessing profile with allosteric positive cooperativity ($n_H = 1.5$) regulated by L-Gln¹⁹. At submicromolar concentrations of L-Asn, as occurs in the blood for the treatment of ALL, L-Gln is the most abundant substrate competing for the active site, and so the enzyme begins to present $n_H = 1.0$, which features Michaelis–Menten kinetics. ScASNase1 showed allosteric behaviour using only L-Asn as the substrate. To evaluate whether L-Gln could regulate the degree of cooperativity for ScASNase1, we also determined the kinetic parameters in the presence of L-Asn and L-Gln at a ratio of 1: 16 for each concentration of L-Asn. However, the addition of L-Gln did not alter the kinetic profile of the enzyme, different of observed to EcASNase2¹⁹ (Fig. 2A,B, Table 1).

Moreover, allosteric enzymes have the characteristic of being inhibited by the product of the reaction^{20,21}; the specific activity of ScASNase1 in the presence of 20 mM L-aspartate showed that the product is not able to interfere with enzyme activity (Fig. 2C). We also tested whether certain ions can act as enzyme–cofactors. The addition of Zn^{2+} and Ca^{2+} resulted in the decrease of ScASNase1 activity. No difference was detected when Mg^{2+} was used, whereas K^+ increased the level of enzymatic activity (Table 2). Since Zn^{2+} and Ca^{2+} diminished the activity of ScASNase1 *in vitro*, we evaluated the effect of the enzymes incubation with human serum over the specific activity of ScASNase1 and EcASNase2; we observed an increase in the activity and no effect, respectively (Fig. 2D), suggesting that in human serum ScASNase1 can be up stimulated and not repressed.

Site-directed mutagenesis of ScASNase1. ScASNase1 shares 38% sequence identity with bacterial type II counterparts, and amino acids already determined as essential to enzyme catalysis are strictly conserved between bacterial enzymes and ScASNase1 (Fig. 3A,B). To verify the importance of conserved catalytic residues to the mechanism of ScASNase1, four residues were replaced individually with alanine by site-directed mutagenesis (highlighted in Fig. 3A). The mutants T64A, Y78A, T141A and K215A were expressed intracellularly and soluble in the BL21 (DE3) *E. coli* strain. The isoforms were purified and analysed by SDS–PAGE. The molecular mass of the isoforms was approximately 45 kDa with the His-tag, and the enzymes obtained were homogeneous and pure (see supplementary Fig. S4). The activities of isoforms were measured by Nessler's reagent in the same conditions as the wild-type enzyme, and a 99.9% loss of activity was observed for all mutants (Fig. 3C). Statistical analysis of the specific activities of the T64A, K215A and T141A mutants showed no significant difference between them. The Y78A mutant presented a significant difference when compared to others, $p \leq 0.05$.

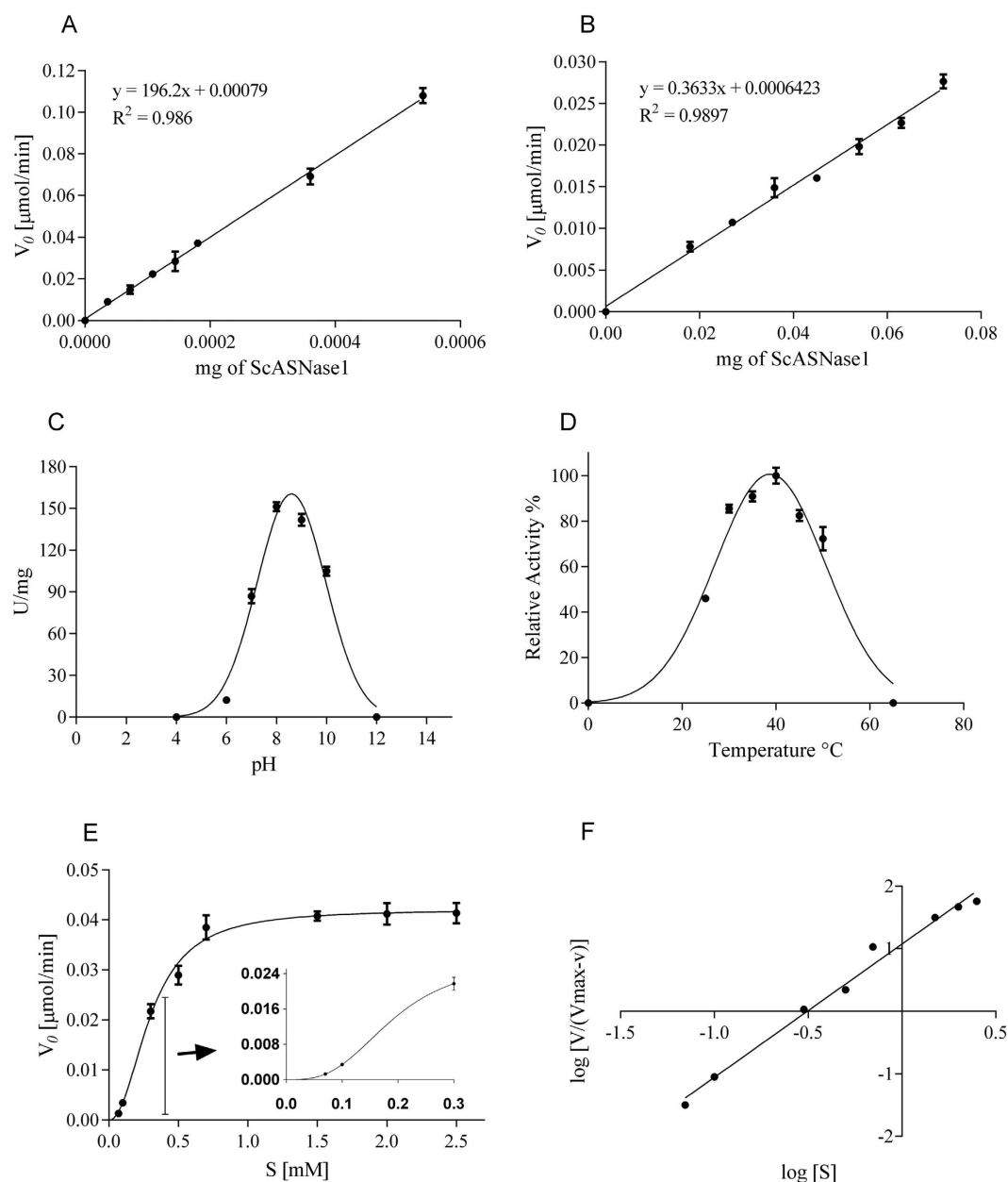


Figure 1. Determination of specific activity, optimum reaction conditions and kinetic characterisation for ScASNase1 enzyme. (A) Specific activity of ScASNase1 to hydrolyse L-Asn: Plot of the reaction velocities (V_0) of L-Asn hydrolysis as a function of mg of purified ScASNase1 as measured by Nessler's reagent. (B) Specific activity of ScASNase1 for L-Gln as measured by coupled assay with NADH oxidation: Plot of the reaction velocities (V_0) of L-Gln hydrolysis as a function of mg of purified ScASNase1. (C) The effect of pH was determined in different buffers (acetate pH 4.0; sodium phosphate pH 6.0, 7.0 and 12.0; Tris-HCl pH 8.0 and 9.0; sodium bicarbonate pH 10.0). (D) Optimum temperature was determined by measuring the specific activity in the range from 25 $^{\circ}\text{C}$ to 50 $^{\circ}\text{C}$. (E) ScASNase1 kinetics, activity dependence on a substrate concentration plot. The inset shows the sigmoidal profile of the enzyme at lower substrate concentrations. (F) Hill plot of the data. Points in the graph represent means $\pm$ SD ($n = 3$).

Recently, similar mutations were performed to the L-asparaginase from guinea pig AspG (amino acids T19A, T116A and K188M, equivalent to the ScASNase1 T64A, T141A and K215A) that also decreased or abrogated the AspG activity²². Additionally, the determination of crystallographic structure of the AspG mutants revealed that no significant differences were observed among the mutants and the wild-type enzyme, indicating that mutations do not exert significant effects on the protein structure but only over the enzyme activity²². To investigate if the amino acids substitutions also exerted influence over ScASNase1 structure we carried out structural approaches using circular dichroism spectroscopy. The analysis of secondary structure revealed that all mutant enzymes presented structural content slightly different to the wild type enzyme (Fig. 3C; Table 3), similar to the observed to AspG and similar to other mutants using a different approach²².

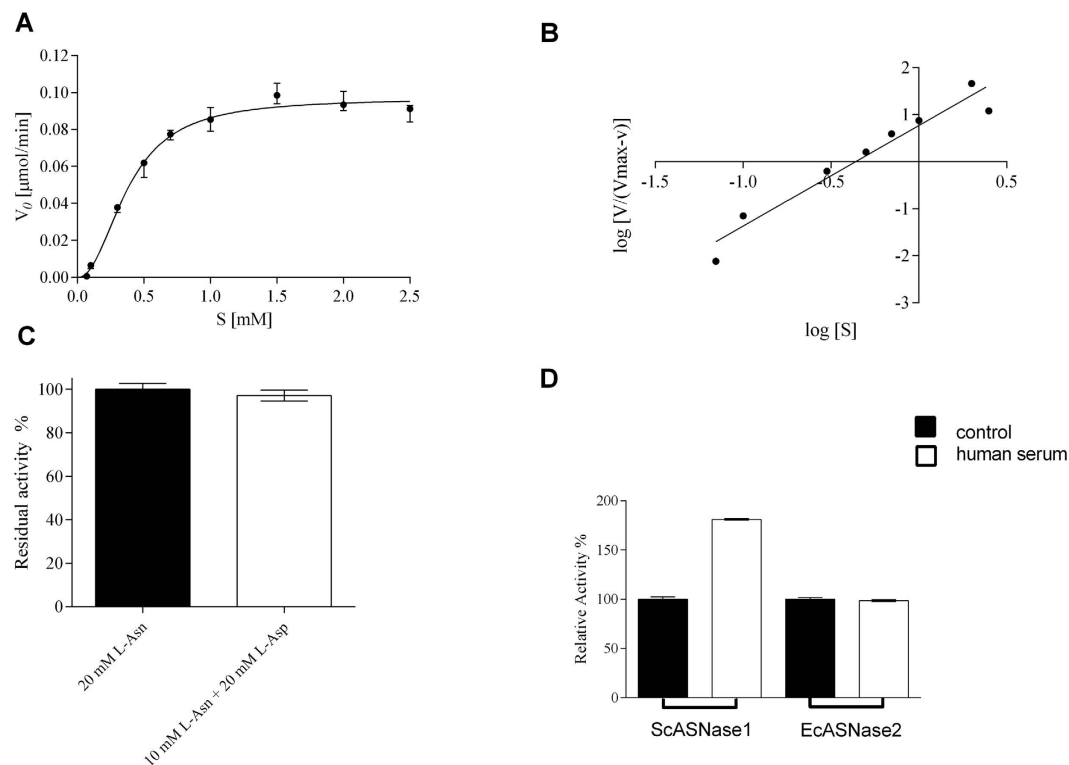


Figure 2. Influence of L-Asp and L-Gln on the parameters of ScASNase1. (A) ScASNase1 kinetic parameters using L-Asn and L-Gln together as substrates at the ratio of 1:16; activity dependence on a substrate concentration plot. (B) Hill plot of the data. Points represent means $\pm$ SD ($n = 3$). (C) Specific activity of ScASNase1 with added L-aspartate. 20 mM L-asparagine (L-Asn, 20 mM) and 10 mM L-asparagine + 20 mM L-aspartate (20 mM L-Asn + 10 mM L-Asp). (D) Specific activity of ScASNase1 and EcASNase2 after incubation at 37°C for 60 minutes with 10% human serum. The graphs of specific activities and kinetic parameters were obtained with GraphPad Prism 6.05 software. The specific activity was quantified by Nessler's reagent. Error bars were calculated from the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

EcASNase2	K_m (μ M)	V_{max} (μ mol/min)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	n_H
L-asparagine	23 ± 5	0.032 ± 0.00061	134 ± 2	5.8×10^6	1.1 ± 0.1
ScASNase1	$K_{0.5}$ (μ M)	V_{max} (μ mol/min)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/[K_{0.5}]^{n_H}$ ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	n_H
L-asparagine	75 ± 27	0.042 ± 0.0011	217 ± 14	1.6×10^4	2.2 ± 0.3
L-asparagine + L-glutamine	122 ± 31	0.097 ± 0.0023	523 ± 34	1.3×10^4	2.2 ± 0.2
EcASNase1 ^{a*}					
L-asparagine	400 ± 50	—	7.4 ± 0.3	5.8×10^{-3}	3.5 ± 0.3

Table 1. Kinetic parameters of ScASNase1 to hydrolyse of L-asparagine and comparison with EcASNases. ^{a*}Kinetics data from Karamitros and Konrad, 2014 – using the same NAD⁺ coupled assay²⁹.

Effector	Concentration	Relative activity %
K ⁺	5.0 mM	109.7%
Mg ²⁺	10.0 mM	100.5%
Zn ²⁺	0.5 mM	7.3%
Ca ²⁺	0.5 mM	0%

Table 2. Relative activity of ScASNase1 in the presence of different effectors.

We also assessed the thermal stability of wild-type ScASNase1 using structure circular dichroism spectroscopy. The thermal profile of ScASNase1 revealed that the enzyme is very thermoresistant, presenting a melting temperature of 68.25 ± 0.21 °C (Fig. 3E), which may be related to the high cysteine content present in the enzyme, which in turn may form structural disulphides (Fig. 3A).

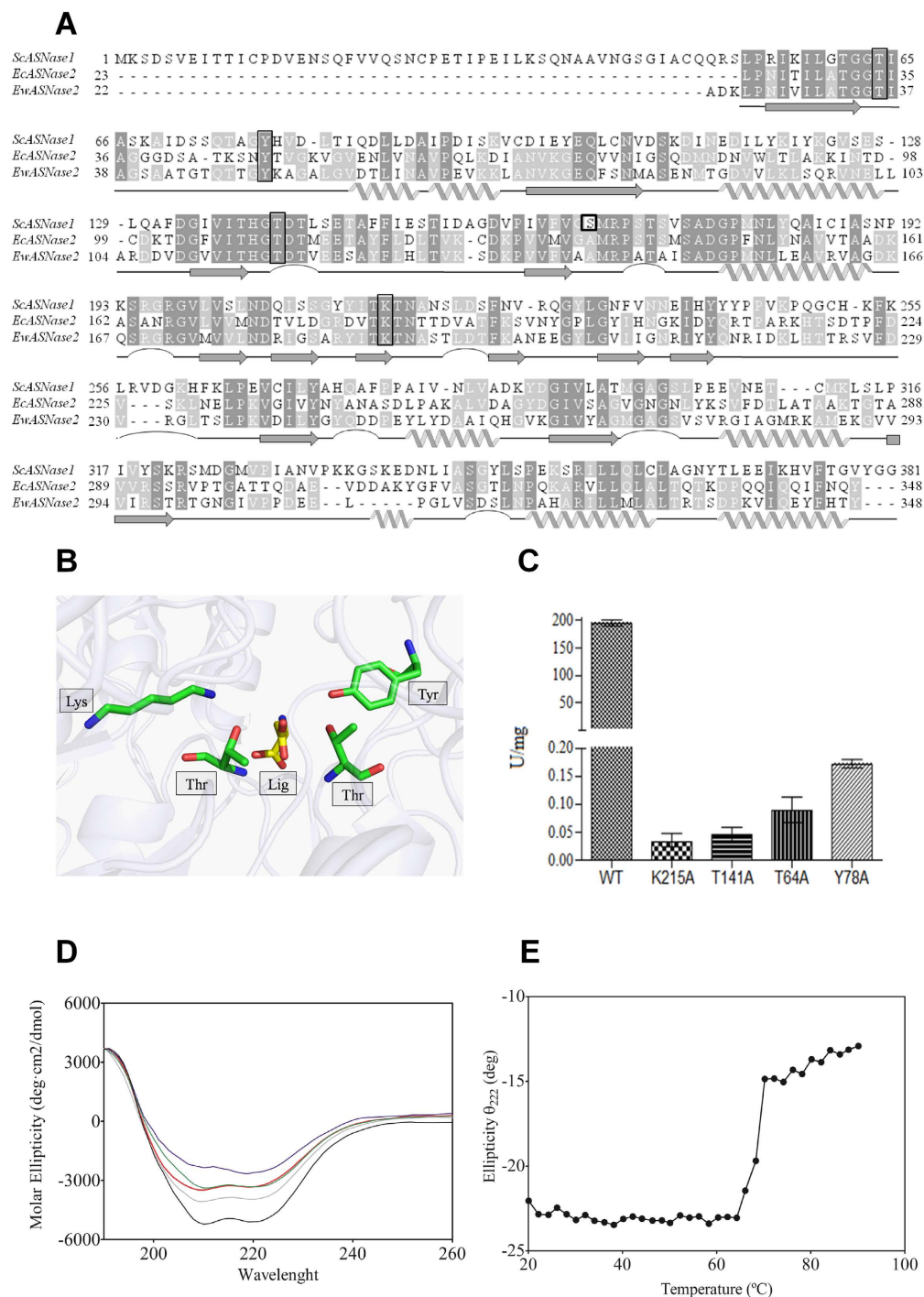


Figure 3. Structural and mutational analysis of ScASNase1. (A) Alignment of L-asparaginase amino acid sequences of *S. cerevisiae* (ScASNase1) (Uniprot number P38986), *E. coli* (EcASNase2) (Uniprot number P00805) and *E. chrysanthemi* (EwASNase2) (Uniprot number P06608). The amino acids are shaded in grey tones according to physico-chemical similarities among the three isoforms. The black boxes denote conserved amino acids involved in catalytic activity. The alignment was produced using Clustal Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), and the graphical representation was generated using JalView (<http://www.jalview.org>). (B) Crystallographic structure of *E. coli* (PDB code = 3ECA), highlighting the position of conserved residues and a ligand molecule. (C) Specific activity of the active site residues mutated in ScASNase1 by an alanine. The error bar represents means $\pm$ SD ($n=3$). (D) Circular dichroism spectra of the ScASNase1 (black) and the mutant enzymes T64A (green), Y78A (red), K125A (grey) and T141A (blue). The protein concentrations used in experiments were $5\mu\text{M}$ in Tris buffer 10 mM (pH 7.4). All spectra were recorded at 25°C and corrected against the buffer. The graphical representations are averages from eight consecutive scans. (E) The thermal melting profile for ScASNase1 was recorded at 222 nm, and the temperature was increased from 20 to 90°C . The protein concentrations used in experiments were $5\mu\text{M}$ in Tris buffer 10 mM (pH 7.4). The melting temperature obtained was $68.25 \pm 0.21^\circ\text{C}$.

	ScASNase1	T64A	Y78A	T141A	K215A
Helix	16.50%	16.36%	16.12%	14.30%	16.93%
Antiparallel	26.65%	26.10%	26.82%	28.21%	26.21%
Parallel	9.25%	9.37%	9.31%	9.60%	9.22%
Beta-turn	16.32%	16.26%	16.23%	15.67%	16.44%
Random Coil	31.28%	31.91%	31.48%	32.22%	31.22%

Table 3. Secondary structure analyzed by circular dichroism spectroscopy. The secondary structure contents were obtained using CDNN software.

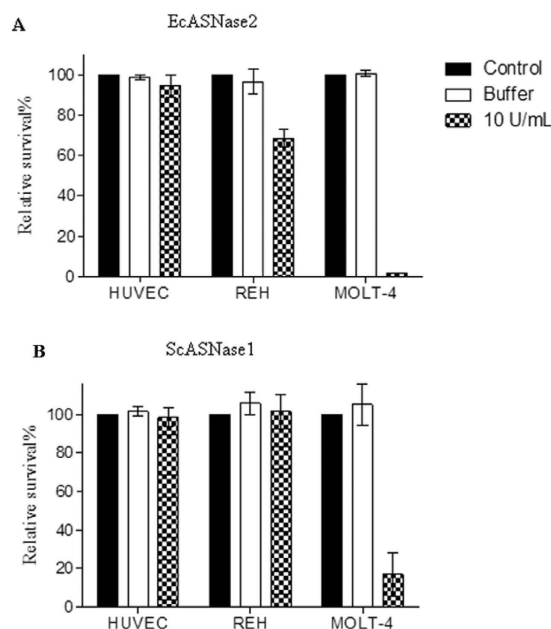


Figure 4. Cytotoxicity assay using HUVEC, REH and MOLT-4 cell lines. (A) Relative survival using EcASNase2. (B) Relative survival using ScASNase1. Cells were incubated with 10 U/mL of ScASNase1 or EcASNase2 (Prospec-Tany, Israel) for 72 h. The control is represented by the cell culture containing only RPMI 1640 medium with 10% foetal bovine serum. The enzyme buffer was Tris-HCl 50 mM pH 8.8 to ScASNase1 or Tris-HCl 50 mM pH 7.4 to EcASNase2. Error bars were calculated from the mean $\pm$ SD (n = 3). Statistical analysis using the ANOVA with Bonferroni test performed using GraphPad Prism 6.05 software showed $p < 0.001$ versus respective control and buffer.

Cytotoxicity of ScASNase1. The cytotoxic potential of ScASNase1 was analysed *in vitro* in three different cell types: HUVEC, as healthy cells that cover the blood vessel wall and are therefore in contact with circulating drugs; REH, considered resistant to treatment with L-ASNase because it has high ASNS levels of expression²³; and MOLT-4, described as a sensitive L-ASNase lineage. Nevertheless, MOLT-4 evolves resistance six weeks after L-ASNase treatment, through the augmented expression of ASNS²⁴.

Cells were incubated with 10 U/mL of ScASNase1 or EcASNase2. Controls were incubated with only RPMI medium or protein buffer for 72 hours (Fig. 4). As expected, the *E. coli* enzyme did not cause toxicity to normal healthy cells HUVEC. However, EcASNase2 treatment killed almost 100% of MOLT-4 cells and 20% of the resistant lineage, REH. Similarly to treatment with EcASNase2, treatment with ScASNase1 did not cause toxicity to normal cells HUVEC and caused death about to 85% of MOLT-4 cells, but REH cells were resistant to ScASNase1 (Fig. 4). Statistical analysis of the data, using ANOVA with the Bonferroni model, demonstrated that the mortality of the REH cells treated with EcASNase2 and MOLT-4 cells in the presence of EcASNase2 or ScASNase1 was significant at a level of $p < 0.001$, compared with the respective controls.

Discussion

To our knowledge, we describe here for the first time the characterization of biochemical and antileukemic activity of the ASNase1 from *S. cerevisiae*, providing evidence of its biopharmaceutical potential. Moreover, the heterologous expression of ScASNase1 was obtained with high purity (see supplementary Fig. 1) through one chromatographic step with specific activity of 196.2 U/mg for L-Asn (Fig. 1A). Only Jones and Mortimer¹⁷ and Dunlop *et al.*¹⁴ had found specific activity of 0.06 U/mg and 5.4 U/mg, respectively, to ScASNase1^{14,16}. However, these authors obtained the enzyme by purification of the native protein direct from *S. cerevisiae* through multiple

chromatographic steps. The specific activity found in our study is similar to that reported for type II L-ASNase from *E. coli* (EcASNase2), as confirmed here using commercial enzyme as control (223 ± 7 U/mg) (see supplementary Fig. S3).

EcASNase2 and EwASNase2 also show specific activity for L-Gln with values corresponding to a range of 2% and 10% of their L-ASNase activities^{4,5}. According to our results, ScASNase1 presents glutaminase activity that is 0.38% of L-ASNase activity (Fig. 1B), which is approximately twenty-five times smaller than that of the commercial enzyme EcASNase2 tested in our laboratory (~10%) (see supplementary Fig. S3).

Glutaminase activity has been demonstrated to be important for effective treatment in ASNS-positive leukemic lines (which express asparagine synthetase), while for the ASNS-negative line (which does not express asparagine synthetase), only L-ASNase activity would be required²⁵. However, another study showed that glutaminase activity in ASNS-negative lines is important to increase the death of leukemic cells, and this effect can be associated with the expression of ASNS by subclones, or with the achievement of L-Asn from other cells²⁶. According to Anishkin *et al.*¹⁹, L-Gln is responsible for ensuring the asparaginase activity of the enzyme at submicromolar concentrations of L-Asn, concentrations that are reached in the serum during ALL treatment. L-Gln was a positive modulator, because in these very low concentrations, EcASNase2 would be unable to recognize the substrate, increasing the affinity of the enzyme for L-Asn¹⁹. This mechanism of regulation justifies the need for L-glutaminase activity for the effective treatment ASNS-negative cells. Nevertheless, this activity is responsible for enhancing adverse effects such as neurotoxicity and hyperammonemia^{4,11}. Thus, an enzyme with low glutaminase activity and dependence, such as ScASNase1, may be of utility in reducing adverse effects in the treatment of ALL in an ASNS-negative patient.

Dunlop *et al.*¹⁴ reported a K_m of $740 \mu\text{M}$ and suggested that ScASNase1 could not deplete low levels of L-Asn. We demonstrated allosteric behaviour (Fig. 1E,F) with a $K_{0.5}$ of $75 \mu\text{M}$ and positive cooperativity, as indicated by n_H of 2.2 (Table 1). Allosteric and cytoplasmic L-ASNs are classified as bacterial type I enzymes, such as L-ASNase1 from *E. coli* (EcASNase1), which has n_H of 3.5 and $K_{0.5} = 0.4 \text{ mM}$ ^{27,28}, and human L-ASNase1 (HsASNase1), which has n_H of 3.9 and $K_{0.5} = 11.5 \text{ mM}$ ²⁹. In the same way as for type I enzymes, ScASNase1 is regulated by the substrate to catalyse the hydrolysis of L-Asn but shows high affinity for the substrate and no inhibition by product (Fig. 2C). However, the catalytic efficiency of ScASNase1 is affected by allosteric behaviour and Hill coefficient^{30,31}. While michaelian EcASNase2 has an efficiency dictated by k_{cat}/K_m of $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ScASNase1 efficiency is defined by $k_{\text{cat}}/[K_{0.5}]^{n_H}$ reaching a value of 10^4 . This is two orders of magnitude lower than EcASNase2, but it is seven orders higher comparing with EcASNase1 (see Table 1).

Because of allosteric behaviour, the effect of ions was tested. The presence of Mg^{2+} did not change the activity and Zn^{2+} and Ca^{2+} decreased the activity (Table 2); this result is indicative that ScASNase1 is not a metalloprotein²⁹. Furthermore, the enzymatic inhibition caused by metal ions and the presence of 10 cysteines in ScASNase1 (Fig. 3A) suggest that certain vicinal sulfhydryl groups are important for protein stabilization, a property described for other L-ASNs^{32,33}. It is noteworthy to cite that the incubation of EcASNase2 with human serum did not affect the activity, while ScASNase1 presented a significant augment of specific activity (Fig. 2D), suggesting that other serum factors can contribute to positive allosteric regulation of the enzyme.

EcASNase2 and EwASNase2 have high affinity for the substrate, with K_m in the μM range^{34–37}. Even with a michaelian profile, EcASNase2 has a degree of cooperativity at submicromolar concentrations of L-Asn, which is modulated by L-Gln¹⁹. The addition of L-Gln during the reaction did not affect the affinity for the substrate or the degree of cooperativity for ScASNase1 (Table 1 and Fig. 2A,B), which is different from that recently described for EcASNase2 and reveals distinct functional characteristics of the yeast enzyme.

Despite structural differences, type I and type II L-ASNs present similarity in their amino acid sequences, and their functional active site residues are conserved throughout evolution^{1,16,38}. The mechanism of action proposed for L-ASNs relies on EcASNase2 observations, in which a first nucleophilic attack of T12 on the substrate is followed by the release of ammonia and formation of the acyl-enzyme complex. In the subsequent step, with K162 and T89, this intermediate undergoes a second nucleophilic attack by a water molecule, resulting in hydrolysis of the acyl-enzyme intermediate, producing the aspartic acid, leaving the free enzyme³⁹. The hydrogen bonds formed between Y25 and T12 promote the correct orientation of T12 for catalysis⁴⁰. A comparison of the primary structure of EcASNase2 and EwASNase2 with ScASNase1 revealed that the active site residues involved in catalysis are conserved in ScASNase1 (Fig. 3A,B). Single substitutions of the T64, Y78, T141 and K215 residues to alanine revealed that all mutants have significant loss of activity compared to the wild-type enzyme (Fig. 3C). Structural analysis of secondary structure content revealed that all mutant enzymes presented similar α -helix and β -sheet content relative to the wild-type ScASNase1 indicating that the amino acids substitutions performed in this work did not affect the integrity of the enzyme structure (Table 3).

Additional analyses aiming to evaluate enzyme thermostability showed that ScASNase1 possesses high thermostability ($\sim 68^\circ\text{C}$ – Fig. 3E), in agreement with kinetic thermal analysis, which revealed that the enzyme retains >60% of its asparaginase activity at 50°C (Fig. 1D).

The main characteristic of bacterial type II enzymes is their antineoplastic potential. The first characterization of ScASNase1 demonstrated low specific activity and a K_m of $740 \mu\text{M}$ for L-Asn¹⁴; this affinity would not allow the depletion of human serum levels of L-Asn, since an enzyme has to be very active at low substrate concentrations to present antineoplastic potential³⁶. Yun *et al.*²⁷ demonstrated the allosteric profile of EcASNase1 and proposed that L-ASNs type I cannot be considered for therapeutics because it does not deplete low levels of L-Asn²⁷. Considering that, asparagine concentration in circulating human serum is $50 \mu\text{M}$ ⁴¹, using the equation 1, equal amount of enzymes and kinetic values of Table 1, we can compare the velocity of reactions in physiological conditions among EcASNase1, EcASNase2 and ScASNase1.

$$v/[E] = k_{\text{cat}} \times [S]^{n_H} / [S]^{n_H} + [K_{0.5}]^{n_H} \quad (1)$$

Equation 1: where v is initial velocity of reaction; $[E]$ is total enzyme concentration; k_{cat} is the turnover constant; $[S]$ is the substrate concentration; $K_{0.5}$ is the concentration of substrate in which enzyme reaches half of maximal velocity and n_H is the Hill coefficient³¹.

In this prediction, EcASNase2 exerts its antileukemic activity with $v = 92 \mu\text{M/s}$; ScASNase1 would present $v = 63 \mu\text{M/s}$, while EcASNase1 would show $v = 0.005 \mu\text{M/s}$. This strongly suggests that, at least in catalytic kinetic terms, ScASNase1 potentially exerts asparaginase activity compatible with antileukemic effect.

In 2013, a study with encapsulated ScASNase1 showed that this enzyme can induce the death of leukemic cell lines *in vitro*⁴². Here, we corroborated this data and also showed that ScASNase1 is active in physiological conditions (pH 7.4 at 37 °C), with optimum activity even at pH 8.6 and 40 °C (Fig. 1C,D) and kills 85% of human acute lymphoblastic leukaemia MOLT-4 cells *in vitro* (Fig. 4). MOLT-4 is an important cell line that has been used to investigate the effect of other L-ASNases, such as L-ASNase from *Erwinia carotovora* and *Helicobacter pylori*. In these cases, 10 U/mL of *Erwinia carotovora* or *Helicobacter pylori* caused mortality of 83% and 30%, respectively, in MOLT-4 cells^{43,44}. Using the same concentration of EcASNase2, the mortality of MOLT-4 cells was 95%⁴³. The REH cell line uses L-Gln pathway asparagine synthetase for the synthesis of L-Asn²³. The low glutaminase activity of ScASNase1 prevents the mortality of this lineage. However, the antileukemic potential of ScASNase1 demonstrated here was superior to that observed for type II enzymes from *Erwinia carotovora* and *Helicobacter pylori* and is equivalent to that caused by EcASNase2 in MOLT-4 cells. It is noteworthy that the non-bacterial origin of ScASNase1 may present an additional advantage in the antileukemic treatment of sensitive lines, reducing the adverse effects due to low glutaminase activity.

In conclusion, our results show that ScASNase1 has specific activity of 196.2 U/mg, which is compatible with the enzymes used in the treatment of ALL and almost forty-fold higher than previously characterized. In addition, it has allosteric behaviour with a $K_{0.5}$ of 75 μM , showing a high affinity for the substrate L-Asn. Residues T64-Y78-T141-K215 play important roles in enzyme catalysis. We suggest that ScASNase1 may have interesting antineoplastic properties, because ScASNase1 shows toxicity for leukemic cells but not to normal healthy cells (HUVCEC), can reduce adverse effects due to low glutaminase activity and may be less immunogenic than bacterial enzymes. ScASNase1 is classified as an enzyme belonging to bacterial type II, has high affinity for the substrate and exhibits antineoplastic properties. However, ScASNase1 also presents characteristics of bacterial type I enzyme, such as allosteric behaviour and cytoplasmic localization in yeast. Additional structural and antileukemic studies that are being conducted by our research group could help to elucidate the active site microenvironment and unique properties of ScASNase1.

Methods

Gene cloning, protein expression and purification of ScASNase1. The *ASP1* gene was isolated from genomic DNA from the BY4741 strain of *S. cerevisiae* by polymerase chain reaction, using the oligonucleotides SC_Asp1F 5' GGGAAATTCATATGTTACCAAGAATCAAATCTTGGG 3' and SC_Asp1R 5' CGCGGATCCTCACCACCATAGAC 3' with restriction site adaptors to *Nde* I and *Bam* HI (Exxtend Biotecnologia São Paulo, Brazil). The PCR product was cloned into *Nde* I and *Bam* HI restriction sites of the pET15b vector (Novagen – Merck Millipore). pET15b-*ASP1* was used to transform *E. coli* DH5 α . Single colonies were selected; their plasmids were extracted and sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit using the ABI 3730 DNA Analyser (Thermo Scientific) automatic sequencer to confirm gene integrity. The correct constructions were used to transform *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen – Merck Millipore) strain by electroporation.

Transformed *E. coli* BL21 (DE3) containing pET15b-*ASP1* were grown overnight at 37 °C in 100 mL of medium LB (10% tryptone, 5% NaCl and 5% yeast extract) containing 50 $\mu\text{g/mL}$ of carbenicillin and then transferred to 1 L of fresh LB containing carbenicillin (50 $\mu\text{g/mL}$) and grown to $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6\text{--}0.8$. Protein expression was induced by IPTG addition to a final concentration of 1 mM for 3 hours at 37 °C. The cells were harvested by centrifugation at $4,000 \times g/4^\circ\text{C}/20\text{ min}$, and the pellet was suspended with start buffer (20 mM sodium phosphate pH 7.4; 300 mM NaCl; 20 mM imidazole) and added to PMSF 1 mM. Cell disruptions were performed by sonication with 30% amplitude, sonicating for 24 cycles of 5 seconds and resting for 15 seconds in ice. The cellular lysate was treated with 1% sulfate streptomycin in ice for 20 min. The suspension was clarified by centrifugation at $16,000 \times g/4^\circ\text{C}/30\text{ min}$ and homogenised by filtration using a 45- μm membrane (Merck–Millipore) and applied to a Hi-Trap nickel-affinity column (GE Healthcare) for purification. The column was equilibrated with 10 volumes of start buffer (20 mM sodium phosphate pH 7.4; 300 mM NaCl; 20 mM imidazole); the protein extract was applied, and the unbound proteins were washed with 5 column volumes using a stepwise gradient of imidazole (20 mM sodium phosphate pH 7.4; 300 mM NaCl; initializing with 50 mM, followed by 100 mM and 150 mM imidazole); ScASNase1 was eluted with 20 mM sodium phosphate pH 7.4; 300 mM NaCl; 500 mM imidazole.

Protein purification and integrity were evaluated by SDS–PAGE according to the method of Laemmli (1970). The ScASNase1 was applied to a PD-10 Desalting Column (GE Healthcare), using 20 mM Tris–HCl pH 8.8 buffer. The protein concentration was measured by spectrophotometry at $\lambda = 280\text{ nm}$, with an extinction coefficient of ScASNase1 ($\epsilon = 25955\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) obtained using the ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Mutagenesis of ScASNase1. Mutants T64A, Y78A, T141A and K215A were obtained using a QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) with pET15b-*ASP1* as the template and the following primers: ASP1T64A_F 5'GGGTACCGGTGGTGCG ATTGCATCGAAAGC 3' and ASP1T64A_R 5'GCTTTCGATGCAATC GCACCACCGGTACCC 3'; ASP1Y78A_F 5'AAACTG CCGGCGCGCATGTTGACCTGACC 3' and ASP1Y78A_R 5'GGTCAGGTCAACATGCGCGCCGGCAGTTT 3'; ASP1T141A_F 5'ATTACCCATGGGGCCGATACGCTAT 3' and ASP1T141A_R 5' ATAGCGTATC GGCCCCATGGGTAAT 3'; ASP1 K215A_F 5' TCTGGTTACTACATTACTGCCACGAATGCAAATAGTTTGG 3' and ASP1 K215A_R 5' CCAAACATTTGCATTCGTGGCAGTAATGTAGTAACCAGA 3'. The products of

the reaction were treated with *Dpn* I to remove the original methylated plasmids. The *E. coli* XL1-Blue strain was used as host in the transformations. The plasmids were sequenced, as described before, to confirm the codon substitutions, and positive ones were used to transform *E. coli* strain BL21 (DE3) (Novagen – Merck Millipore) by electroporation. The recombinant enzymes were expressed and purified as described for the wild-type enzyme.

Enzyme activity assay. To determine the level of L-ASNase-specific activity, we measured the ammonia produced by the hydrolysis of L-Asn (Sigma–Aldrich/USA) catalysed by the enzyme through Nessler's reagent (Merck–Millipore). The protocol used was adapted to a microplate reader according to the manufacturer's instructions. The reaction containing 50 mM Tris–HCl (pH 8.8), 20 mM L-Asn and 36–540 ng of enzyme was incubated at 37 °C for 20 min; the reaction was stopped with trichloroacetic acid (TCA) 1.5 M and then diluted in water (10×) followed by the addition of Nessler's reagent. The same assay was used to determine the interference of L-Aspartate (L-Asp) in the reaction, using 10 mM L-Asn + 20 mM L-Asp. For the mutant isoforms T64A, Y78A, T141A and K215A, 0.03–0.27 mg protein were used with 20 mM L-asparagine. The reactions were incubated for 1 hour at 37 °C. The results were recorded spectrophotometrically at $\lambda = 440_{\text{nm}}$ using the SpectraMax Microplate Reader (Molecular Devices). The standard curve was constructed with ammonium sulfate using concentrations ranging from 0 to 20 $\mu\text{mol/mL}$ ⁴⁵.

Glutaminase activity was estimated spectrophotometrically using an NADH oxidation coupled assay adapted from Balcão, *et al.*⁴⁶. The L-glutamate (L-Glu) produced in the hydrolysis of L-Gln by L-ASNase is used for the synthesis of α -ketoglutarate in the presence of L-glutamate dehydrogenase (GDH) (Sigma–Aldrich/USA) and β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Sigma–Aldrich/USA). The reactions were performed using microplates as follows: 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 20 mM L-Gln, 0.13 mM NADH, 0.5 U GDH (diluted in 50 mM sodium phosphate pH 7.4; 50% glycerol) and 0 mg to 0.09 mg of ScASNase1 enzyme or the commercial enzyme EcASNase2 (Prospec–Tany, Israel), which was used as a positive control. The absorbance was measured at $\lambda = 340_{\text{nm}}$ at 37 °C, and the extinction coefficient used was $\epsilon = 0.85 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Effect of pH and temperature on ScASNase1. To determine the optimum pH for ScASNase1, enzyme activity was measured at 37 °C in different buffers: acetate pH 4.0; sodium phosphate pH 6.0, 7.0 and 12.0; Tris–HCl pH 8.0 and 9.0; sodium bicarbonate pH 10.0. To determine the optimum temperature, enzyme activity was measured from 25 °C to 65 °C. After 20 min of reaction, the ammonium generated was measured by Nessler's reagent as described above.

Determination of specific activity of ScASNase1 in the presence of Zn^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} and human serum. The final concentrations of reagents were used in all assays: L-asparaginase (1–30 nM), Tris–HCl buffer pH 8.8 50 mM, 20 mM L-asparagine. The enzyme was pre-incubated at 37 °C for 30 minutes with each compound at concentrations of 0.5 or 10 mM from Zn^{2+} , K^+ , Mg^{2+} or Ca^{2+} . To assay with human serum, ScASNase1 and EcASNase2 were pre-incubated at 37 °C for 60 minutes with 10% human serum (Agilent Technologies).

The reactions were incubated at 37 °C for 20 minutes with L-asparagine. The ammonium release was measured using Nessler's reagent as described above.

Kinetic analysis. The kinetic parameters of purified ScASNase1 to hydrolysis of L-Asn were determined by spectrophotometry through NADH-consumption-coupled assay as adapted from Balcão, *et al.*⁴⁶. The ammonia released is used in the production of L-Glu in the presence of GDH and reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NADH) (Sigma). NADH oxidation was measured spectrophotometrically at $\lambda = 340_{\text{nm}}$ at 37 °C, and the extinction coefficient used was $\epsilon = 0.85 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Microplates received 50 mM Tris–HCl pH 8.0; 0.07 mM, 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 0.7 mM, 1.5 mM, 2.0 mM and 2.5 mM of L-Asn, 0.13 mM β -NADH, 1 mM α -ketoglutarate 0.5 U GDH (diluted in 50 mM sodium phosphate pH 7.4; 50% glycerol) and 180 ng of ScASNase1. A second assay was conducted at the same concentrations of L-Asn and ScASNase1 with added L-Gln at a ratio of 1:16 for each concentration of L-Asn. The concentrations of L-Gln used were 1.12 mM, 1.6 mM, 4.8 mM, 8.0 mM, 11.2 mM, 24 mM, 32 mM and 40 mM. The substrate affinity and turnover number were determined using non-linear regression analysis of experimental steady-state data using GraphPad Prism version 6.05 software. Kinetic parameters were determined under the same conditions described above for commercial enzyme EcASNase2 (Prospec–Tany, Israel).

Circular dichroism spectroscopy of ScASNase1. The CD spectra of ScASNase1 native and reduced proteins were obtained using a 0.1 cm path length cuvette containing 10 μM of protein sample in 5 mM Tris buffer (pH 7.4). The assays were carried out at 25 °C in a Jasco J-815 spectropolarimeter (Jasco Inc.). The spectra are representative of an average of eight scans recorded from 190 to 260 nm. The content of secondary structures in each protein (wild-type and mutants) was estimated using CDNN 2.1 software⁴⁷. Melting profiles at a constant wavelength of 222 nm, θ_{222} , were recorded while the sample was heated from 20 to 95 °C, with a 1 °C increment/min.

Cells culture and cytotoxicity assay. The leukaemia human cell lineage MOLT-4 and REH, as well as the Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) were obtained from the Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ/Brazil). Cells were maintained in RPMI 1640 medium with 10% foetal bovine serum (v/v) and incubated at 37 °C in a 5% CO_2 incubator. These procedures followed the ATCC instructions (<http://www.atcc.org/>). After reaching confluence, cell lineages were centrifuged at $600 \times g$ at 4 °C for 10 min and suspended in fresh RPMI medium. MOLT-4, REH or HUVEC, at 1.0×10^4 cells/well, were incubated in 24-well microplates with and without 10.0 U/mL of ScASNase1 or EcASNase2. As a control, the cells were incubated with RPMI medium and with protein buffer (50 mM Tris–HCl pH 8.8 for ScASNase1 and 50 mM Tris–HCl pH 7.4 for EcASNase2) for 72 hours at 37 °C in a 5% CO_2 incubator. Cells were centrifuged at $600 \times g$ at 4 °C for 10 min, then stained with Trypan blue

(Sigma–Aldrich/USA) to select dead cells. Cells were counted in a Neubauer chamber to determine cell viability, which is expressed as a percentage of living cells.

Statistical Analysis. All analyses were performed, at least, in triplicate. Results were represented as mean $\pm$ standard deviation (SD). The statistical analysis was performed using ANOVA, considering $p \leq 0.05$, and using GraphPad Prism version 6.05 software.

References

- Borek, D. & Jaskólski, M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Bioch. Pol.* **48**, 893–902 (2001).
- Schwartz, J. H., Reeves, J. Y. & Broome, J. D. Two L-Asparaginases from *E. coli* and their action against tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 1516–1519 (1966).
- Cedar, H. & Schwartz, J. H. Localization of the two L-Asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **242**, 3753–3755 (1967).
- Narta, U. K., Kanwar, S. S. & Asmi, W. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukaemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **61**, 208–221 (2007).
- Avramis, V. I. Asparaginases: Biochemical pharmacology and modes of drug resistance. *Anticancer Res.* **32**, 2423–2438 (2012).
- Emadi, A., Zokaee, H. & Sausville, E. A. Asparaginase in the treatment of non ALL hematologic malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **73**, 875–883 (2014).
- Akagi, T. *et al.* Methylation analysis of asparagine synthetase gene in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* **20**, 1303–1306 (2006).
- Pastorczyk, A. *et al.* Asparagine synthetase (ASNS) gene polymorphism is associated with the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia by affecting early response to treatment. *Leuk. Res.* **38**, 180–183 (2014).
- Narazaki, H. *et al.* Delayed-type hypersensitivity in response to L-asparaginase in a case of acute lymphoblastic leukemia. *J. Nippon Med.* **79**, 489–493 (2012).
- Pieters, R. *et al.* L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. *Cancer* **117**, 238–249 (2011).
- Raetz, E. A. & Salzer, W. L. Tolerability and efficacy of L-asparaginase therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **32**, 554–563 (2010).
- Rizzari, C. *et al.* Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Co-oncology* **25**, S1–S9 (2013).
- Shrivastava, A. *et al.* Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **100**, 1–10 (2016).
- Dunlop, P. C., Meyer, G. M., Ban, D. & Roon, R. J. Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **253**, 1297–1304 (1978).
- Sinclair, K., Warner, J. P. & Bonthron, D. T. The *ASP1* gene *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the intracellular isozyme of L-asparaginase. *Gene* **144**, 37–43 (1994).
- Bonthon, D. T. & Jaskólski, M. Why a “benign” mutation kills enzyme activity. Structure-based analysis of the A176V mutant of *Saccharomyces cerevisiae* L-asparaginase I. *Acta Biochimica Polonica* **44**, 491–504 (1997).
- Jones, G. E. & Mortimer, R. K. Biochemical Properties of Yeast L-Asparaginase. *Biochemical Genetics* **9**, 131–14 (1973).
- Ricard, J. & Cornish-Bowden, A. Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on. *Eur. J. Biochem.* **166**, 255–272 (1987).
- Anishkin, A. *et al.* Catalytic role of the substrate defines specificity of therapeutic L-asparaginase. *J. Mol. Biol.* **427**, 1–19 (2015).
- Gerhart, J. From feedback inhibition to allostery: the enduring example of aspartate transcarbamoylase. *FEBS Journal* **218**, 612–620 (2014).
- Cornish-Bowden, A. Understanding allosteric and cooperative interactions in enzymes. *FEBS Journal* **281**, 621–632 (2014).
- Schalk, A. M., Antansijevic, A., Caffrey, M. & Lavie, A. Experimental Data in Support of a Direct Displacement Mechanism for Type I/II L-Asparaginases. *J. Biol. Chem.* **291**, 5088–5100 (2016).
- Hermanova, I., Zaliova, M., Trka, J. & Starkova, J. Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. *Exp. Hematol.* **40**, 657–665 (2012).
- Aslanian, A. M., Fletcher, B. S. & Kilberg, M. S. Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce l-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem. J.* **357**, 321–328 (2001).
- Chan, W. K. *et al.* The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood* **123**, 3596–3606 (2014).
- Parmentier, J. H. *et al.* Glutaminase activity determines cytotoxicity of l-asparaginases on most leukemia cell lines. *Leuk. Res.* **39**, 757–762 (2015).
- Yun, M., Nourse, A., White, S. W., Rock, C. O. & Heath, R. J. Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase I. *J. Mol. Biol.* **369**, 794–811 (2007).
- Karamitros, C. S. & Konrad, M. Human 60-kDa Lysophospholipase contains an N-terminal L-asparaginase domain that is allosterically regulated by L-Asparagine. *J. Biol. Chem.* **289**, 12662–12975 (2014).
- Borek D., Kozak M., Pei J. & Jaskolski M. Crystal structure of active site mutant of antileukemic L-asparaginase reveals conserved zinc-binding site. *FEBS J.* **281**, 4097–4111 (2014).
- Cornish-Bowden, A. & Cárdenas, M. L. Specificity of Non-Michaelis–Menten Enzymes: Necessary Information for Analyzing Metabolic Pathway. *J. Phys. Chem. B.* **49**, 16209–16213 (2011).
- Kuo, Y. M., Henry, R. A. & Andrews, A. J. Measuring specificity in multi-substrate/product systems as a tool to investigate selectivity *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* **1**, 70–76 (2016).
- Kumar, K., Kaur, J., Walia, S., Pathak, T. & Aggarwal, D. L. l-asparaginase: an effective agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma* **55**, 256–262 (2014).
- Warangkar, S. C. & Khobragade, C. N. Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *Enzyme Res.* 1–10 (2010).
- Kotzia, G. A. & Labrou, N. E. L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. *Journal of Biotechnology* **127**, 657–669 (2007).
- Gervais, D. & Foote, N. Recombinant deamidated mutants of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase have similar or increased activity compared to wild-type enzyme. *Mol Biotechnol.* **56**, 865–877 (2014).
- Broome, J. D. Factors which may influence the effectiveness of L-asparaginase as tumor inhibitors. *British Journal of Cancer* **22**, 595–602 (1968).
- Derst, C., Hensling, J. & Röhm, K. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. *Protein Sci.* **9**, 2009–2017 (2000).
- Lopes, A. M. *et al.* Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Crit Rev Biotechnol.* 1–18 (2015).
- Palm, G. J. *et al.* A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase: Crystal structure of a Thr-89-Val mutant. *FEBS Journal* **390**, 211–216 (1996).

40. Aung, H. P., Bocola, M., Schleper, S. & Röhm, K. H. Dynamics of a mobile loop at the active site of *Escherichia coli* asparaginase. *Biochim Biophys Acta*. **1481**, 349–359 (2000).
41. Rifai, K. *et al.* Changes in plasma amino acids during extracorporeal liver support by fractionated plasma separation and adsorption. *Artif. Organs* **34**, 166–170 (2010).
42. Karamitros, C. S., Yashchenok, A. M., Möhwald, H., Skirtach, A. G. & Konrad, M. Preserving catalytic activity and enhancing biochemical stability of the therapeutic enzyme asparaginase by biocompatible multilayered polyelectrolyte microcapsules. *Biomacromolecules* **14**, 4398–4406 (2013).
43. Papageorgiou, A. C., Posypanova, G. A., Andersson, C. S., Sokolov, N. N. & Krasotkina, J. Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *FEBS Journal* **275**, 4306–4316 (2008).
44. Cappelletti, D. *et al.* *Helicobacter pylori* L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* **377**, 1222–1226 (2008).
45. Orsonneau, J. L. *et al.* Automated kinetic assay of plasmatic L-asparaginase activity undergoing therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Annales de Biologie Clinique* **62**, 568–572 (2004).
46. Balcão, V. M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Malcará, A. X. & Guisán, J. M. Structural and functional stabilization of L-Asparaginase via multisubunit immobilization onto highly activated supports. *Biotechnol.* **17**, 537–542 (2001).
47. Böhm, G., Murh, R. & Jaenicke, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* **5**, 191–195 (1992).

Acknowledgements

This research was supported by grants from State of São Paulo Research Foundation (FAPESP/Brazil), process number 2013/16685-2, 2015/07749-2, 2015/03477-8 and 2013/08617-7. We thank technician Paula Gabriela da Cunha for her assistance with the cytotoxicity assay.

Author Contributions

I.M.C., G.M., M.A.d.O., S.H.P.F. and A.P. designed the experiments and wrote the manuscript; I.M.C., L.S., M.S.M.L. and B.d.A.B.P. performed the experiments and analysed data.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Costa, I. M. *et al.* Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. *Sci. Rep.* **6**, 36239; doi: 10.1038/srep36239 (2016).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

Apêndice B

Pedido de patente nº BR 10 2016 024702-0 A2

Oliveira M. A., Monteiro, G., Pessoa, A., Schultz, L., Costa, I. M., Toyama, M. H., Farsky, S. H. P. Método de obtenção de L-Asparaginase recombinante de baixa massa molar, L-Asparaginase recombinante e uso da mesma.

(54) MÉTODO PARA FIXAÇÃO SEM USO DE SOLDA DE PLACA IDENTIFICADORA COM PROJEÇÕES RADIAIS ANGULARES (DENTES) POR INSERÇÃO VERTICAL EM RECIPIENTE DE GÁS LIQUEFEITO DE PETRÓLEO

(71) MIGUEL CARLOS BOVE (BR/SP)

(72) MIGUEL CARLOS BOVE

(21) BR 10 2016 024702-0 A2

Seq. (nt)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

Código 3.1 - Publicação do Pedido de Patente ou de Certificado de Adição de Invenção

(22) 21/10/2016

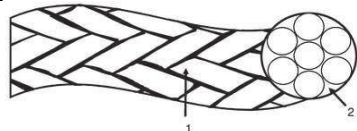
(51) C12N 9/82 (2006.01), C12N 15/55 (2006.01), A61K 38/50 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01)

(54) MÉTODO DE OBTENÇÃO DE L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE DE BAIXA MASSA MOLAR, L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE E USO DA MESMA

(71) UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA " JÚLIO DE MESQUITA FILHO (BR/SP) , UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP (BR/SP)

(72) MARCOS ANTONIO DE OLIVEIRA, GISELE MONTEIRO DE SOUZA, ADALBERTO PESSOA JUNIOR, LEONARDO SCHULTZ DA SILVA, IRIS MUNHOZ COSTA, MARCOS HIRAKI TOYAMA, SANDRA HELENA POLISELLI FARSKY

(21) BR 10 2016 024715-2 A2



Código 3.1 - Publicação do Pedido de Patente ou de Certificado de Adição de Invenção

(22) 21/10/2016

(51) A61L 17/10 (2006.01)

(54) FIO DE SUTURA CIRÚRGICA COM COBERTURA ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULA

(71) UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA (BR/PB)

(72) ISABELA ALBUQUERQUE PASSOS FARIAS, FÁBIO CORREIA SAMPAIO, CARLOS CHRISTIANO LIMA DOS SANTOS, JOCIANELLE MARIA FÉLIX FERNANDES NUNES, JAILSON MACHADO FERREIRA, DAWY KEYSON DE ARAÚJO ALMEIDA, MAX ROCHA QUIRINO

(21) BR 10 2016 025324-1 A2

Código 3.1 - Publicação do Pedido de Patente ou de Certificado de Adição de Invenção

(22) 28/10/2016

(30) 03/12/2015 US 14/958210

(51) B61F 3/00 (2006.01), B61F 5/00 (2006.01), B61F 5/50 (2006.01)

(54) TRUQUE DE VAGÃO DE CARGA FERROVIÁRIO

(71) AMSTED RAIL COMPANY, INC. (US)

Apêndice C

Lista das sequências utilizadas

Classe1

UniProt Code	Organism
A5Z2U5	<i>Caenorhabditis elegans</i>
P90758	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Q9U3P0	<i>Caenorhabditis elegans</i>
A0A0B2UVE1	<i>Toxocara canis</i>
Q9U518	<i>Dirofilaria immitis</i>
Q9VH61	<i>Drosophila melanogaster</i>
Q9W4N6	<i>Drosophila melanogaster</i>
W6V2H1	<i>Echinococcus granulosus</i>
W6UU87	<i>Echinococcus granulosus</i>
R7U2D0	<i>Capitella teleta</i>
A0A210PUS4	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>
A0A2C9JPP0	<i>Biomphalaria glabrata</i>
A0A0L8FVN8	<i>Octopus bimaculoides</i>
W4XVJ1	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
UPI00096B442C	<i>Amphimedon queenslandica</i>
UPI00096AE09E	<i>Amphimedon queenslandica</i>
T2MB55	<i>Hydra vulgaris</i>
A7SXJ3	<i>Nematostella vectensis</i>
A7E2I9	<i>Danio rerio</i>
A0A0R4IU93	<i>Danio rerio</i>
E7FAX7	<i>Danio rerio</i>
A7E2I9	<i>Danio rerio</i>
UPI0004574641	<i>Callorhinchus milii</i>
A0JNU3	<i>Mus musculus</i>
O88202	<i>Rattus norvegicus</i>
Q86U10	<i>Homo sapiens</i>
H0W0T5	<i>Cavia porcellus</i>
R1F1J2	<i>Emiliana huxleyi</i>
A0A1Q3ER19	<i>Lentinula edodes</i>
A0A1Q3ERA1	<i>Lentinula edodes</i>
V2X5I5	<i>Moniliophthora roreri</i>
A8NEP2	<i>Coprinopsis cinerea</i>
A0A1M2W537	<i>Trametes pubescens</i>
A0A0H2RFC5	<i>Schizopora paradoxa</i>

A0A0B7F3Y5	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
A0A0K6FQ58	<i>Rhizoctonia solani</i>
A0A0F7S7K3	<i>Sporisorium scitamineum</i>
E3KH31	<i>Puccinia graminis</i>
A0A0L6VH06	<i>Puccinia sorghi</i>
I7MJV7	<i>Tetrahymena thermophila</i>
A0A0V0QR69	<i>Pseudocohnilembus persalinus</i>
A0A078ANR1	<i>Stylonychia lemnae</i>
I4YIJ1	<i>Wallemia mellicola</i>
K2R980	<i>Macrophomina phaseolina</i>
E9DS71	<i>Metarhizium acridum</i>
D2C0U1	<i>Dickeya zeae</i>
P0A962	<i>Escherichia coli</i>
C7RBC6	<i>Kangiella koreensis</i>
A7T8U6	<i>Nematostella vectensis</i>
E9BC85	<i>Leishmania donovani</i>
E9AQ41	<i>Leishmania mexicana</i>
S9WUR2	<i>Angomonas deanei</i>
A0A0S4JTX6	<i>Bodo saltans</i>
E9BUH3	<i>Leishmania donovani</i>
E9ATM7	<i>Leishmania mexicana</i>
A0A1X0P1U7	<i>Trypanosoma theileri</i>
A0A0S4J4T5	<i>Bodo saltans</i>
A0A0M0LS84	<i>Chrysochromulina sp.</i>
A0A086M127	<i>Toxoplasma gondii</i>
F0VBR1	<i>Neospora caninum</i>
A0A2C6L303	<i>Cystoisospora suis</i>
A0A0G4GDJ8	<i>Vitrella brassicaformis</i>
A0A0G4IAA5	<i>Chromera velia</i>
X6M1J9	<i>Reticulomyxa filosa</i>
C5L7N0	<i>Perkinsus marinus</i>
A0A058Z8W7	<i>Fonticula alba</i>
E1F7T1	<i>Giardia intestinalis</i>
V6LVX1	<i>Spironucleus salmonicida</i>
A0A0A1UHD6	<i>Entamoeba invadens</i>
C4LTU4	<i>Entamoeba histolytica</i>
A0A0A1U7T4	<i>Entamoeba invadens</i>
A0A1Y2AFW0	<i>Naematelia encephala</i>
A0A1B9IKZ6	<i>Kwoniella mangroviensis</i>
C1FDI1	<i>Micromonas commoda</i>
C1MGS2	<i>Micromonas pusilla</i>
Q00WU7	<i>Ostreococcus tauri</i>
A4S6P8	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>

A0A059LPQ9	<i>Helicosporidium sp</i>
A0A087SJU0	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>
E1Z8H3	<i>Chlorella variabilis</i>
A0A1X6NUE1	<i>Porphyra umbilicalis</i>
R7Q8Z1	<i>Chondrus crispus</i>
G2TN05	<i>Bacillus coagulans</i>
P26900	<i>Bacillus subtilis</i>
D4CP93	<i>Oribacterium sp.</i>
C4Z6A6	<i>Eubacterium eligens</i>
Q8PUM7	<i>Methanosarcina mazei</i>
Q8TR66	<i>Methanosarcina acetivorans</i>
Q46GJ6	<i>Methanosarcina barkeri</i>
Q12X65	<i>Methanococcoides burtonii</i>
B0R6H4	<i>Halobacterium salinarum</i>
Q18GL3	<i>Haloquadratum walsbyi</i>
O29380	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
Q979L8	<i>Thermoplasma volcanium</i>
Q9HJJ5	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
P61401	<i>Nanoarchaeum equitans</i>
A4FWR5	<i>Methanococcus maripaludis</i>
P61400	<i>Methanococcus maripaludis</i>
A9AA46	<i>Methanococcus maripaludis</i>
A6VGK5	<i>Methanococcus maripaludis</i>
A6UPR4	<i>Methanococcus vannieli</i>
Q60331	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
A5UK11	<i>Methanobrevibacter smithii</i>
Q2NEH1	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>
O26802	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>
Q8TV84	<i>Methanopyrus kandleri</i>
C3N5E7	<i>Sulfolobus islandicus</i>
C3MYR5	<i>Sulfolobus islandicus</i>
C3MPS1	<i>Sulfolobus islandicus</i>
Q97ZH5	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
Q4J955	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
Q971W5	<i>Sulfolobus tokodaii</i>
A4YHH3	<i>Metallosphaera sedula</i>
Q8ZY04	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>
A1RX40	<i>Thermophilum pendens</i>
Q9Y9T8	<i>Aeropyrum pernix</i>
Q5JI77	<i>Thermococcus kodakarensis</i>
Q8U0X0	<i>Pyrococcus furiosus</i>
O59132	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
Q9V0T9	<i>Pyrococcus abyssi</i>

A0A1X7R2P0	<i>Kazachstania saulgeensis</i>
H2AS25	<i>Kazachstania africana</i>
G0VH02	<i>Naumovozya castellii</i>
J7R473	<i>Kazachstania naganishii</i>
G0W8I3	<i>Naumovozya dairenensis</i>
J8PY57	<i>Saccharomyces arboricola</i>
P38986	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A0L8RPD7	<i>Saccharomyces eubayanus</i>
A7TMX1	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>
Q6FRP1	<i>Candida glabrata</i>
G8BSM6	<i>Tetrapisispora phaffii</i>
I2GVG3	<i>Tetrapisispora blattae</i>
A0A1Q3AE80	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
C5DW00	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
S6E492	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
G8ZV70	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
A0A1G4K3K8	<i>Lachancea sp.</i>
A0A0C7N6W4	<i>Lachancea lanzarotensis</i>
A0A1G4JLU8	<i>Lachancea meyersii</i>
A0A1G4IS04	<i>Lachancea dasiensis</i>
A0A1G4KKG8	<i>Lachancea nothofagi</i>
A0A0P1KMB4	<i>Lachancea quebecensis</i>
C5E3N2	<i>Lachancea thermotolerans</i>
A0A1G4J5K8	<i>Lachancea mirantina</i>
A0A1G4M6P4	<i>Lachancea fermentati</i>
A0A1E5R1R8	<i>Hanseniaspora osmophila</i>
A0A120K1U2	<i>Eremothecium sinicaudum</i>
Q6CQZ8	<i>Kluyveromyces lactis</i>
A0A0A8L479	<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>
UPI00050D700D	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
W0TFW9	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
R9XBC4	<i>Ashbya aceri</i>
Q74Z49	<i>Ashbya gossypii</i>
G8JX88	<i>Eremothecium cymbalariae</i>
UPI000542ECA9	<i>Candida albicans</i>
B9WN17	<i>Candida dubliniensis</i>
M3HP16	<i>Candida maltosa</i>
A3GI76	<i>Scheffersomyces stipitis</i>
A0A1B2J686	<i>Komagataella pastoris</i>
F2QVZ4	<i>Komagataella phaffii</i>
P0CZ17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
P0CX79	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
P0CX78	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

P0CX77	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F0XAV9	<i>Grosmannia clavigera</i>
F9XGD5	<i>Zymoseptoria tritici</i>
Q8NKC0	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
P87015	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Q9UTS7	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Q8TFF8	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
G7XS43	<i>Aspergillus kawachii</i>
A2QBE5	<i>Aspergillus niger</i>
UPI00015863F6	<i>Botryotinia fuckeliana</i>
A1D4Y2	<i>Neosartorya fischeri</i>
B8MYC9	<i>Aspergillus flavus</i>
A0A109FIJ0	<i>Rhodotorula sp</i>
A0A1Y2EQG5	<i>Leucosporidium creatinivorum</i>
P06608	<i>Dickeya chrysanthemi</i>
O34482	<i>Bacillus subtilis</i>
A0A0G4GD60	<i>Vitrella brassicaformis</i>
Q88K39	<i>Pseudomonas putida</i>
P10182	<i>Pseudomonas sp</i>
O68897	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Q9I407	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
B1LTN5	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
P10172	<i>Acinetobacter glutaminasificans</i>
P43843	<i>Haemophilus influenzae</i>
P00805	<i>Escherichia coli</i>
A9L095	<i>Shewanella baltica</i>
Q9ZLB9	<i>Helicobacter pylori</i>
O25424	<i>Helicobacter pylori</i>
P50286	<i>Wolinella succinogenes</i>
E8YF52	<i>Burkholderia sp.</i>
A0A1U9MRN6	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
Q9RRX9	<i>Deinococcus radiodurans</i>
P63628	<i>Mycobacterium bovis</i>
Q9X7E6	<i>Mycobacterium leprae</i>
P30363	<i>Bacillus licheniformis</i>

Classe 2

UniProt Code	Organism
Q8VI04	<i>Rattus norvegicus</i>
Q8C0M9	<i>Mus musculus</i>
A0A286XYM2	<i>Cavia porcellus</i>
Q32LE5	<i>Bos taurus</i>

Q7L266	<i>Homo sapiens</i>
Q4R7U8	<i>Macaca fascicularis</i>
Q5BKW9	<i>Danio rerio</i>
A0A0R4IA75	<i>Danio rerio</i>
Q6GM78	<i>Xenopus laevis</i>
A7S3Z9	<i>Nematostella vectensis</i>
A7T1K5	<i>Nematostella vectensis</i>
T2MAA6	<i>Hydra vulgaris</i>
F1R0Q9	<i>Danio rerio</i>
C3ZI16	<i>Branchiostoma floridae</i>
A7SDS7	<i>Nematostella vectensis</i>
A7SDS8	<i>Nematostella vectensis</i>
A7RM62	<i>Nematostella vectensis</i>
B4F5D1	<i>Drosophila melanogaster</i>
B4F5D2	<i>Drosophila melanogaster</i>
B4F5C5	<i>Drosophila melanogaster</i>
B4F5C6	<i>Drosophila melanogaster</i>
B4F5C8	<i>Drosophila melanogaster</i>
B4F5C7	<i>Drosophila melanogaster</i>
C0MLA9	<i>Drosophila melanogaster</i>
B4F5C9	<i>Drosophila melanogaster</i>
Q29I93	<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>
Q9ZSD6	<i>Lupinus luteus</i>
C0KY81	<i>Withania somnifera</i>
P30364	<i>Lupinus angustifolius</i>
P50288	<i>Lupinus albus</i>
P30362	<i>Lupinus arboreus</i>
P50287	<i>Arabidopsis thaliana</i>
D7M184	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>
Q84TZ5	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>
B4UWB5	<i>Arachis hypogaea</i>
Q8H2A9	<i>Glycine max</i>
Q2PW34	<i>Phaseolus vulgaris</i>
G7J705	<i>Medicago truncatula</i>
Q8GXC1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Q0E667	<i>Pinus sylvestris</i>
Q7UGC2	<i>Rhodopirellula baltica</i>
B0E278	<i>Laccaria bicolor</i>
A0A2A9NLY5	<i>Amanita thiersii</i>
A0A0D7AG81	<i>Fistulina hepatica</i>
C9SYP1	<i>Verticillium alfalfae</i>
G2X601	<i>Verticillium dahliae</i>
C1GRR1	<i>Paracoccidioides lutzii</i>

E7FA20	<i>Danio rerio</i>
P37595	<i>Escherichia coli</i>
Q7CQV5	<i>Salmonella typhimurium</i>
Q6DAX0	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
Q54WW4	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Q8U4E6	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Q5JHT1	<i>Thermococcus kodakarensis</i>
O57971	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
Q9V262	<i>Pyrococcus abyssi</i>
Q8YQB1	<i>Nostoc sp.</i>
P74383	<i>Synechocystis sp.</i>
B9TM88	<i>Ricinus communis</i>
C3Y3E2	<i>Branchiostoma floridae</i>
B4I7X1	<i>Drosophila sechellia</i>
B4QGM0	<i>Drosophila simulans</i>
Q9W2C3	<i>Drosophila melanogaster</i>
B4P8E0	<i>Drosophila yakuba</i>
Q28XQ5	<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>
B4GHE3	<i>Drosophila persimilis</i>
B4QHB1	<i>Drosophila simulans</i>
B4HT15	<i>Drosophila sechellia</i>
B4NWI1	<i>Drosophila yakuba</i>
B4JVV6	<i>Drosophila grimshawi</i>
Q28Y14	<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>
Q21697	<i>Caenorhabditis elegans</i>
A7T6T0	<i>Nematostella vectensis</i>
A7RFG0	<i>Nematostella vectensis</i>
H0UZ36	<i>Cavia porcellus</i>
A0A286XC02	<i>Cavia porcellus</i>
Q4R6C4	<i>Macaca fascicularis</i>
P20933	<i>Homo sapiens</i>
P30919	<i>Rattus norvegicus</i>
Q64191	<i>Mus musculus</i>
A8KC00	<i>Danio rerio</i>
A0A140LGI7	<i>Danio rerio</i>
C3XWB2	<i>Branchiostoma floridae</i>
A7RFF9	<i>Nematostella vectensis</i>
T2MH59	<i>Hydra vulgaris</i>
L1JFZ7	<i>Guillardia theta</i>
Q47898	<i>Elizabethkingia miricola</i>
Q7ZZ30	<i>Danio rerio</i>
F1QE55	<i>Danio rerio</i>
A0A0R4IE07	<i>Danio rerio</i>

Q08CE9	<i>Danio rerio</i>
A7SD31	<i>Nematostella vectensis</i>
C3Z9E5	<i>Branchiostoma floridae</i>
H0UX35	<i>Cavia porcellus</i>
A0A286XBL8	<i>Cavia porcellus</i>
Q9H6P5	<i>Homo sapiens</i>
Q8R1G1	<i>Mus musculus</i>
A5PMQ0	<i>Danio rerio</i>
C3YF82	<i>Branchiostoma floridae</i>
B6VDM6	<i>Vigna radiata</i>
O65268	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9P6N7	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
T2M5Z2	<i>Hydra vulgaris</i>
A7SKS4	<i>Nematostella vectensis</i>
A0A165YBX6	<i>Peniophora sp.</i>
A0A0H2RZC8	<i>Schizopora paradoxa</i>
G5EF83	<i>Caenorhabditis elegans</i>

Classe 3

UniProt Code	Organism
Q55865	<i>Synechocystis sp</i>
L8AP50	<i>Bacillus subtilis</i>
A0A068N0Z8	<i>Synechocystis sp</i>
G5J2Q1	<i>Crocospaera watsonii</i>
B1WTU2	<i>Cyanothece sp.</i>
I4G9G2	<i>Microcystis aeruginosa</i>
K9T5I1	<i>Pleurocapsa sp</i>
K9XWX2	<i>Stanieria cyanosphaera</i>
B7KCB4	<i>Cyanothece sp.</i>
E0UHH0	<i>Cyanothece sp.</i>
B2ITK4	<i>Nostoc punctiforme</i>
K9WY98	<i>Cylindrospermum stagnale</i>
G6FQT2	<i>Fischerella thermalis</i>
K9W1V4	<i>Crinalium epipsammum</i>
K9XJE2	<i>Gloeocapsa sp.</i>
O68614	<i>Synechococcus sp</i>
Q9K4F5	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Q54237	<i>Streptomyces griseus</i>
B1Z293	<i>Burkholderia ambifaria</i>
Q0BA14	<i>Burkholderia ambifaria</i>
Q9RFN5	<i>Rhizobium etli</i>
Q5AR85	<i>Emericella nidulans</i>

X0BDG7	<i>Fusarium oxysporum</i>
W3X9S6	<i>Pestalotiopsis fici</i>
C7Z4H4	<i>Nectria haematococca</i>
I1RZI0	<i>Gibberella moniliformis</i>
W7M546	<i>Gibberella moniliformis</i>
V5G157	<i>Byssosclamyces spectabilis</i>
N4VY33	<i>Colletotrichum orbiculare</i>
Q92RD4	<i>Rhizobium meliloti</i>
Q7D0K7	<i>Agrobacterium fabrum</i>
Q985M0	<i>Mesorhizobium japonicum</i>

ASNases bacterianas classe 1

UniProt Code	Organism
A0A1X9SP47	<i>Campylobacter lanienae</i>
A0A0A8HTC0	<i>Campylobacter lari</i>
I7GSX0	<i>Helicobacter cinaedi</i>
A0A377J634	<i>Helicobacter canis</i>
A0A377JMQ7	<i>Helicobacter cinaedi</i>
E0RGY9	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
O34482	<i>Bacillus subtilis</i>
D5E220	<i>Bacillus megaterium</i>
A0A0X9NR27	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
A0A1U7P089	<i>Deinococcus marmoris</i>
A0A158KID5	<i>Caballeronia arvi</i>
A0A0H3I5Z1	<i>Pectobacterium parmentieri</i>
A0A1M5L5E2	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
A0A3A5E7F3	<i>Dickeya solani</i>
P06608	<i>Dickeya chrysanthemi</i>
A0A318P4S5	<i>Serratia plymuthica</i>
A0A169TXP2	<i>Klebsiella oxytoca</i>
A0A285B2A2	<i>Klebsiella grimontii</i>
B5XSE6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
A0A377R9E4	<i>Klebsiella aerogenes</i>
A0A1W1K2Y1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
O68897	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Q9I407	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Q88K39	<i>Pseudomonas putida</i>
A0A0N0GR24	<i>Amantichitinum ursilacus</i>
B9Z4M3	<i>Pseudogulbenkiania ferrooxidans</i>
A0A225SR83	<i>Herbaspirillum aquaticum</i>

A0A2N3PVB2	<i>Telmatospirillum siberiense</i>
A0A2N5X3E0	<i>Halioglobus lutimaris</i>
A0A2W0BKX7	<i>Acidobacteria bacterium</i>
A7ZG80	<i>Campylobacter concisus</i>
A0A0S4SLL3	<i>Campylobacter fetus</i>
P50286	<i>Wolinella succinogenes</i>
A0A0M0HW13	<i>Vibrio hepatarius</i>
A9L095	<i>Shewanella baltica</i>
A0A2G2RYS9	<i>Aeromonas dhakensis</i>
A0A3N6VJ12	<i>Aeromonas jandaei</i>
A0A2X4RME3	<i>Aeromonas caviae</i>
A0A162I721	<i>Aeromonas veronii</i>
A0A1C2LDF5	<i>Aeromonas hydrophila</i>
A4SIC2	<i>Aeromonas salmonicida</i>
A0A085AFK7	<i>Trabulsiella guamensis</i>
A0A2A2MHL4	<i>Hafnia paralvei</i>
F0JQ99	<i>Escherichia fergusonii</i>
Q32C26	<i>Shigella dysenteriae</i>
F3WMF1	<i>Shigella boydii</i>
A0A370V2R2	<i>Escherichia marmotae</i>
P00805	<i>Escherichia coli</i>
A0A0I3A0M8	<i>Shigella sonnei</i>
A0A377VF33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
A0A0M3E926	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
A0A155ZD81	<i>Enterobacter cloacae</i>
D2TSY1	<i>Citrobacter rodentium</i>
A0A2T8MEM0	<i>Salmonella anatum</i>
A0A0F6B6K9	<i>Salmonella typhimurium</i>
Q57K10	<i>Salmonella choleraesuis</i>

ASNases de vertebrados

UniProt Code	Organism
A0A2K6E1X6	<i>Macaca nemestrina</i>
A0A2K5V4N0	<i>Macaca fascicularis</i>
A0A2K6E1Y9	<i>Macaca nemestrina</i>
A0A2K5V4K6	<i>Macaca fascicularis</i>
A0A2K6E1W5	<i>Macaca nemestrina</i>
F7BSN9	<i>Macaca mulatta</i>
A0A2K5MWF7	<i>Cercocebus atys</i>
A0A2K5MWG2	<i>Cercocebus atys</i>
A0A2K5Z3D7	<i>Mandrillus leucophaeus</i>
A0A2K5Z3E2	<i>Mandrillus leucophaeus</i>
A0A2I3MDP0	<i>Papio anubis</i>
A0A2I3MR66	<i>Papio anubis</i>

A0A0D9RBM6	<i>Chlorocebus sabaues</i>
A0A2K6MPS4	<i>Rhinopithecus bieti</i>
A0A2K6REP3	<i>Rhinopithecus roxellana</i>
A0A2K6MPS8	<i>Rhinopithecus bieti</i>
A0A2K6MPM9	<i>Rhinopithecus bieti</i>
A0A2K5IMA7	<i>Colobus angolensis palliatus</i>
A0A2I3T4C4	<i>Pan troglodytes</i>
H2Q8Z8	<i>Pan troglodytes</i>
A0A2R8Z648	<i>Pan paniscus</i>
A0A2R8Z616	<i>Pan paniscus</i>
G3S857	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>
G3QL40	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>
H0YHD3	<i>Homo sapiens</i>
Q86U10	<i>Homo sapiens</i>
G3V1Y8	<i>Homo sapiens</i>
K7EVB6	<i>Pongo abelii</i>
A0A2J8SZ98	<i>Pongo abelii</i>
H2NMD4	<i>Pongo abelii</i>
G1S2L3	<i>Nomascus leucogenys</i>
G1S2L6	<i>Nomascus leucogenys</i>
A0A2K6UP12	<i>Saimiri boliviensis boliviensi</i>
A0A2K6UP61	<i>Saimiri boliviensis boliviensi</i>
A0A2K6UNZ4	<i>Saimiri boliviensis boliviensi</i>
A0A2K5PFC0	<i>Cebus capucinus imitator</i>
A0A2K5PFC2	<i>Cebus capucinus imitator</i>
A0A2K6EPW2	<i>Propithecus coquereli</i>
A0A2U3VL17	<i>Odobenus rosmarus divergens</i>
A0A2U3Y5V5	<i>Leptonychotes weddellii</i>
G1MID2	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>
M3XT59	<i>Mustela putorius furo</i>
M3WUT4	<i>Felis catus</i>
A0A2I2UZI6	<i>Felis catus</i>
G3U9Z9	<i>Loxodonta africana</i>
F6ZVE2	<i>Equus caballus</i>
L5JR45	<i>Pteropus alecto</i>
L8HQ40	<i>Bos mutus</i>
F1MGH2	<i>Bos taurus</i>
A0A287A2K4	<i>Sus scrofa</i>
A0A287B8W1	<i>Sus scrofa</i>
A0A1U7TVW5	<i>Tarsius syrichta</i>
G3H389	<i>Cricetulus griseus</i>
A0JNU3	<i>Mus musculus</i>
O88202	<i>Rattus norvegicus</i>
A0A0G2JSM2	<i>Rattus norvegicus</i>
A0A1U8BVR3	<i>Mesocricetus auratus</i>

A0A1U8BWH3	<i>Mesocricetus auratus</i>
A0A061HZ04	<i>Cricetulus griseus</i>
A0A1S3F7F3	<i>Dipodomys ordii</i>
H0W0T5	<i>Cavia porcellus</i>
G1TF44	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
I3MZ13	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>
G3WI03	<i>Sarcophilus harrisii</i>
A0A1S3QQH2	<i>Salmo salar</i>
A0A1S3QP07	<i>Salmo salar</i>
A0A1S3QPS5	<i>Salmo salar</i>
A0A1S3QPY5	<i>Salmo salar</i>
A0A1S3QQ69	<i>Salmo salar</i>
A0A1S3QQG5	<i>Salmo salar</i>
A0A1S3QQA7	<i>Salmo salar</i>
A0A1S3QS47	<i>Salmo salar</i>
A0A1S3QQJ8	<i>Salmo salar</i>
A0A1S3SNY1	<i>Salmo salar</i>
B5X1B1	<i>Salmo salar</i>
A0A1S3SNY5	<i>Salmo salar</i>
A0A1S3SNY5	<i>Salmo salar</i>
A0A1W4Y4G7	<i>Scleropages formosus</i>
A0A1W4XUA4	<i>Scleropages formosus</i>
E7FAX7	<i>Danio rerio</i>
A0A0R4IU93	<i>Danio rerio</i>
A0A2R8QPE1	<i>Danio rerio</i>
E9QCJ1	<i>Danio rerio</i>
A7E2I9	<i>Danio rerio</i>
W5KL91	<i>Astyanax mexicanus</i>
A0A146Z943	<i>Fundulus heteroclitus</i>
A0A146Z919	<i>Fundulus heteroclitus</i>
A0A147B4X9	<i>Fundulus heteroclitus</i>
A0A146NJI8	<i>Fundulus heteroclitus</i>
A0A146NIE7	<i>Fundulus heteroclitus</i>
M4ALS6	<i>Xiphophorus maculatus</i>
A0A087XBE5	<i>Poecilia formosa</i>
H2MN78	<i>Oryzias latipes</i>
A0A2I4BM10	<i>Austrofundulus limnaeus</i>
I3KW93	<i>Oreochromis niloticus</i>
I3KW92	<i>Oreochromis niloticus</i>
W5N5J3	<i>Lepisosteus oculatus</i>
W5N5I7	<i>Lepisosteus oculatus</i>
Q4KLT4	<i>Xenopus laevis</i>
A0A1L8FA32	<i>Xenopus laevis</i>
F6ZQY2	<i>Xenopus tropicalis</i>
B1H3F8	<i>Xenopus tropicalis</i>

A0A1V4KAN7	<i>Patagioenas fasciata monilis</i>
A0A1V4KAJ5	<i>Patagioenas fasciata monilis</i>
A0A2I0MQ41	<i>Columba livia</i>
A0A091R1D6	<i>Mesitornis unicolor</i>
A0A091P5F7	<i>Apaloderma vittatum</i>
A0A091V7D1	<i>Nipponia nippon</i>
A0A093HPX7	<i>Gavia stellata</i>
A0A091KDT0	<i>Colius striatus</i>
A0A091G0K3	<i>Cuculus canorus</i>
A0A091LQI8	<i>Cariama cristata</i>
A0A093KFY1	<i>Fulmarus glacialis</i>
A0A091TJN2	<i>Phaethon lepturus</i>
A0A087R5B8	<i>Aptenodytes forsteri</i>
A0A093NBE1	<i>Pygoscelis adeliae</i>
A0A093QM58	<i>Phalacrocorax carbo</i>
A0A093C2R9	<i>Tauraco erythrolophus</i>
A0A087VLV9	<i>Balearica regulorum gibbericeps</i>
A0A091L1X4	<i>Cathartes aura</i>
A0A093H647	<i>Tyto alba</i>
A0A091PU38	<i>Haliaeetus albicilla</i>
A0A0A0ABH0	<i>Charadrius vociferus</i>
A0A091PUH2	<i>Leptosomus discolor</i>
U3JJT7	<i>Ficedula albicollis</i>
A0A218UQP4	<i>Lonchura striata domestica</i>
A0A091EDZ8	<i>Corvus brachyrhynchos</i>
A0A093PLL6	<i>Manacus vitellinus</i>
A0A091WFJ3	<i>Opisthocomus hoazin</i>
A0A093I5E1	<i>Dryobates pubescens</i>
A0A091IE12	<i>Calypte anna</i>
K7G1W5	<i>Pelodiscus sinensis</i>
G1KXK4	<i>Anolis carolinensis</i>
G1KWA3	<i>Anolis carolinensis</i>

Apêndice D

Santos, M. C.; Breyer, C. A.; Schultz, L.; Romanello, K. S.; Cunha, A. F.; Tairum Jr., C. A.; de Oliveira, M. A. *Saccharomyces cerevisiae* Peroxiredoxins in Biological Processes: Antioxidant Defense, Signal Transduction, Circadian Rhythm, and More. In: Old Yeasts - New Questions. [s.l.] InTech, 2017. v. 2p. 64.

***Saccharomyces cerevisiae* Peroxiredoxins in Biological Processes: Antioxidant Defense, Signal Transduction, Circadian Rhythm, and More**

Melina C. Santos, Carlos A. Breyer,
Leonardo Schultz, Karen S. Romanello,
Anderson F. Cunha, Carlos A. Tairum Jr and
Marcos Antonio de Oliveira

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70401>

Abstract

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a model organism for biochemical and genetic studies, and several very important discoveries of fundamental biological processes have been conducted using this yeast as an experimental organism. An emerging concept, which is validated by several works using this organism, relies on the biological importance of oxidant species, specially the hydroperoxides. These molecules were formed during aerobic biological process and control several intracellular mechanisms such as a range of signaling pathways, cell cycle, programmed cell death, circadian rhythm, aging, and lifespan extension. Thereby, cellular homeostasis depends on a refined control of hydroperoxides levels and low-molecular-weight molecules in combination with antioxidant enzymes playing a role in this equilibrium. This proposal is focused on the *S. cerevisiae* peroxiredoxins and their role in peroxide decomposition, signal transduction, circadian clocks, and aging as model enzymes for the study and comprehension of these biological processes in living organisms, including humans.

Keywords: thiol-specific antioxidant protein, functional transitions, peroxidase, chaperone, overoxidation

1. Introduction

The use of *Saccharomyces cerevisiae* as a biological model in the field of oxidant species research represents a very important tool in an exciting area. Emerging concepts, validated by several

works, revealed the importance of oxidant molecules in biological processes, especially the hydroperoxides [1, 2]. These molecules are formed during several aerobic biological processes and, in adequate levels, are involved in a number of intracellular mechanisms, such as redox signaling pathways related to cell cycle progression, programmed cell death, circadian rhythm, aging, and lifespan extension [2–7]. However, the accumulation of these molecules can be harmful to the cells [3, 4]. In fact, highly deleterious radical species can be generated from hydroperoxides, such as hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), that is generated from hydrogen peroxide (H_2O_2) through Fenton and Harber-Weiss reactions. The $\cdot\text{OH}$ is able to oxidize carbohydrates, lipids, proteins, and DNA, being extremely toxic to cells. Thereby, cellular homeostasis depends on a refined control of hydroperoxides levels, and this role is played by both low-molecular-weight molecules, such as glutathione and ascorbic acid, as well as by antioxidant enzymes such as glutathione peroxidases (Gpxs), catalases (Cats), and peroxiredoxins (Prxs) [2, 4]. The latter ones have been subject of intense studies since works involving kinetic approaches indicate that the Prxs decompose more than 90% of cellular hydroperoxides [8, 9]. Additionally, to exert their biological functions, several Prxs are able to perform amazing structural switches, revealing an intricate puzzle among protein structure and function [10–12].

The first Prx described was a cytosolic enzyme identified in *S. cerevisiae* and received the name of “thiol-specific antioxidant protein 1” (Tsa1) [13]. Subsequently, a second homologue cytosolic isoform, named Tsa2, was identified and characterized. Currently, there are five Prx isoforms identified in this yeast. In mammals, there are six isoforms described, and as in other organisms, they are located in several cellular environments as cytosol, nucleus, peroxisome, mitochondria, endoplasmic reticulum, and even in the nucleus [14, 15]. Furthermore, these proteins are very abundant. For example, in *S. cerevisiae*, they can reach ~0.9% of total soluble proteins and can represent one of ten most expressed enzymes in bacteria and in mammal cells [16]. In human erythrocytes, PrxII is the third most abundant protein, only losing in concentration for globins and carbonic anhydrase, and its level is modulated during cell differentiation [17].

Besides the widespread cellular distribution and abundance, Prx stands out due to their highly efficient ability to decompose a wide variety of hydroperoxides (H_2O_2 , nitrite peroxide, lipid peroxides, among others), with second order rates reaching $\sim 10^6$ – $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [18–21]. These characteristics place the Prx as one of the main modulators of hydroperoxides levels and, consequently, of the cellular processes mediated by them. The Prx enzymes are able to decompose hydroperoxides without any prosthetic group, but using only a highly reactive cysteine residue named peroxidatic cysteine (C_p) [5, 22]. All the Prxs described to date present a conserved motif containing the C_p (PXXXT/SXXC $_\text{p}$), which is oxidized to cysteine sulfenic acid (C_p -SOH) after hydroperoxide reduction [10]. This enzyme family is very heterogeneous, and different classifications have been proposed; the most currently used one subdivides these proteins in three large subclasses, 1-Cys Prx, typical 2-Cys Prx, and atypical 2-Cys Prx, based in the number of cysteines involved in catalytic cycle and structural aspects (**Figure 1**). The 1-Cys Prxs are homodimeric proteins that present only one cysteine residue, the C_p , involved in hydroperoxide catalysis. 2-Cys Prxs may be monomeric (in the case of some atypical 2-Cys Prx) or homodimeric proteins and present a second cysteine residue,

named resolving cysteine (C_R), which condenses with C_P forming a disulfide bond as final product during the catalytic cycle. In typical 2-Cys Prx, the disulfide is intermolecular (e.g., between different monomers), while in atypical 2-Cys Prx, the disulfide is intramolecular (in the same monomer) [23].

Among the different Prx subclasses, the typical 2-Cys Prxs are the best studied, and, from this point on, our focus will be on this Prx subclass. After oxidation, the disulfide bond of the typical 2-Cys Prx is frequently reduced by the low-molecular-weight (~11 kDa) enzyme thioredoxin (Trx). The oxidized Trx is reduced by thioredoxin reductase (TrxR), which uses electrons from nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) *via* a flavin adenine dinucleotide (FAD) molecule. Together, Trx, TrxR, and NADPH are named thioredoxin system (Trx system) [21]. It is important to mention that all electron exchanges between the proteins are performed using catalytic cysteines [25] (**Figure 2**).

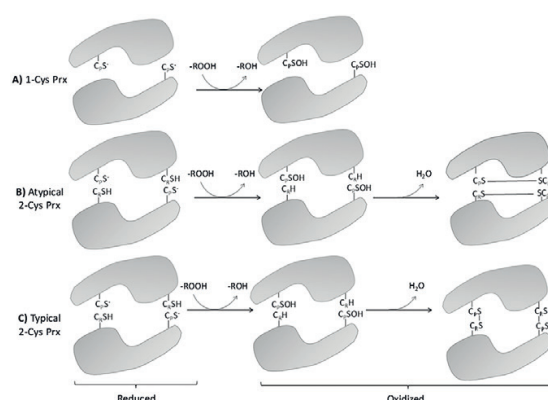


Figure 1. Prx subclasses in reduced and oxidized states. For all enzymes, the first step of the catalytic cycle is represented by the attack of the C_P-S^- over the O—O from hydroperoxide forming cysteine sulfenic acid (C_P-SOH) and releasing $R-OH$. (A) 1-Cys are dimeric enzymes containing only the peroxidatic cysteine, which is stable in oxidized state (C_P-SOH). (B) In the atypical 2-Cys Prx, the oxidized cysteine (C_P-SOH) formed after hydroperoxide decomposition condenses with the C_R-SH from the same monomer forming an intramolecular disulfide bond. (C) In typical 2-Cys Prx, the C_P-SOH condenses with C_R from the adjacent monomer forming an intermolecular disulfide.

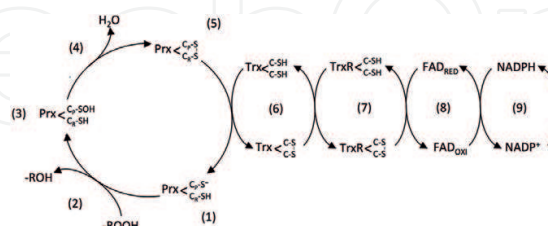


Figure 2. Hydroperoxide reduction steps by typical 2-Cys Prx and Trx system. The Prx C_P in thiolate form (1) attacks the hydroperoxide (2), releasing a water molecule in the case of H_2O_2 reduction, or an alcohol when the substrate is an organic hydroperoxide (the “R” represents the hydroperoxide radical). C_P is oxidized to cysteine sulfenic acid (3), releases a water molecule (4) and condenses with C_R forming an intermolecular disulfide (5), which is reduced by the enzyme Trx (6). Trx disulfide is reduced by the cysteines from TrxR enzyme (7) using electrons from NADPH (9) *via* a FAD molecule (8).

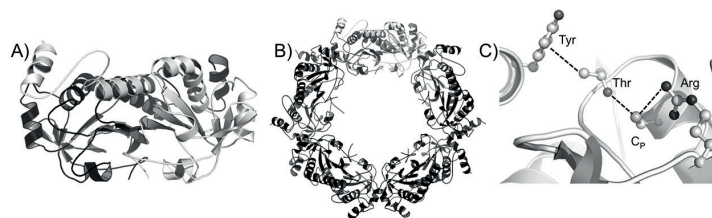


Figure 3. Quaternary structures of the typical 2-Cys Prx. (A) The yeast Tsa1 homodimer is represented in cartoon. (B) $\alpha 2(5)$ decamer formed by the association of five homodimers. (C) Microenvironment of the CP in the active site. The Thr and Arg residues are involved in the thiolate (S^-) stabilization. Additionally, the Thr residue is able to perform a CH- π interaction with the C atoms of a Tyr ring from the adjacent dimer. The proteins are represented in cartoon, and catalytic triad and the Tyr residue are represented in ball and stick. Figures were generated using the *S. cerevisiae* Tsa1 crystallographic coordinates (PDB: 3SBC) and Pymol software (<http://www.pymol.org/>).

Despite that the basic functional unit of the typical 2-Cys Prx is represented by a $\alpha(2)$ homodimer, studies using the Tsa1 and Tsa2 isoforms from *S. cerevisiae* revealed that this oligomeric state presents low peroxidase activity, and the highest reactivity of the typical 2-Cys Prx is reached when these proteins are found in a ring-shaped $\alpha 2(5)$ decamers (association of five homodimers; **Figure 3A**). It is believed that the alternation between these two quaternary structures is responsible for the modulation of their peroxidase activity and may be involved in signal transduction (**Figure 3B**) [10]. Additionally, the typical 2-Cys Prx enzymes may also present other oligomeric states that will be discussed posteriorly.

The high reactivity of Prx over hydroperoxides is related to the maintenance of C_p in thiolate form (C_p-S^-), suitable for catalysis as a consequence of the microenvironment of the active site. The C_p thiolate is stabilized by polar interactions with a threonine (or a serine, in some cases) and an arginine residue (**Figure 3C**). These three residues (Thr, C_p , and Arg) are named catalytic triad and are widely conserved among all Prxs described to date [10]. During catalysis, a guanidine group of the Arg residue is able to perform a hydrogen bond with the proximal oxygen (O) of the hydroperoxide, allowing the nucleophilic attack of the C_p over the hydroperoxide [24]. The O_γ from Thr, in turn, would act as an acceptor of the hydrogen bond with the distal O from hydroperoxide, aiding the positioning of the molecule in a productive way to catalysis [24].

Typical 2-Cys Prxs, such as *S. cerevisiae* Tsa1 and Tsa2, are still able to perform additional structural and functional switches acting as peroxide sensors, molecular chaperones and are involved in several hydroperoxide-dependent signal transduction pathways, as it will be discussed further [20, 21]. Tsa1 and Tsa2 are also evolutionarily related to human PrxI and PrxII. In fact, Tsa1 presents 67% of identity and 77% of similarity with human PrxII, while Tsa2 presents 60% of identity and 76% of similarity with human PrxI, which places these proteins as important models to the study of the human Prx and the biological processes related to them.

2. Redox cycle and structural transitions

During the redox cycle, some typical 2-Cys Prxs are able to transit between different oligomeric species: $\alpha 2(5)$ decamers (reduced enzyme) and $\alpha 2$ dimers (disulfide oxidized protein). Aiming to understand the details of the catalytic cycle and structural transitions, we have

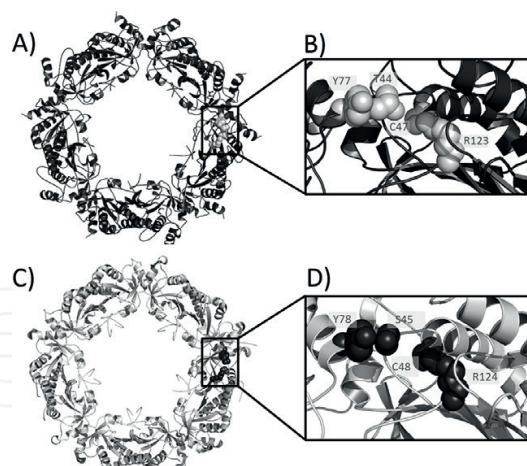


Figure 4. Tsa1 and Tsa2 interactions at dimer-dimer interface. Cartoon representations of quaternary structures of the Tsa1 and Tsa2. (A) Representation of the Tsa1 decamer in cartoon. (B) Interaction between Thr44 and Tyr77 in Tsa1 decamer interface. (C) Tsa2 decamer in cartoon. (D) Interaction between Ser45 and Tyr78 in the Tsa2 decamer interface. In (B) and (D) the atoms are represented by spheres and colored as follow: O = red, C = yellow, N = blue. The figures were generated using the *S. cerevisiae* Tsa1 (PDB: 3SBC) and Tsa2 (PDB: 5DVB) coordinates and the Pymol software (<http://www.pymol.org/>).

determined the crystallographic structure of Tsa1 [21]. In fact, the analysis of the structure revealed an interaction of the Thr from the active site motif, at the dimer-dimer interface of the decamer. Recently, using different methodological approaches as site-directed mutagenesis, biochemical approaches, size exclusion chromatography, and structural analysis, we have demonstrated that a slight difference in the PXXXT(S)XXC_p is involved in decamers to dimers transitions [10]. While Tsa1 possess a Thr residue embedded in the conserved motif, in Tsa2, the Thr is naturally substituted by a Ser (**Figure 4**). In fact, the Tsa1 enzyme, containing Thr residue, transits between dimers (oxidized form) and decamers (reduced enzyme), but the Ser-containing enzyme Tsa2 is not able to dissociate in dimers. Indeed, the rearrangements as consequence of the redox states in the Tsa1 may cause hysteric hindrance of the Thr Oγ with the Tyr aromatic ring of the adjacent monomer, causing the decamer dissociation. Since Tsa2 presents a Ser residue, the hysteric clash probably is avoided. These characteristics may indicate an additional regulation of Prx quaternary structure, which may have implications in biological processes.

3. Prx overoxidation: structural and functional implications

During the typical 2-Cys Prx catalytic cycle under high levels of hydroperoxides, before disulfide formation, C_p-SOH can be attacked by another hydroperoxide molecule and becomes overoxidized to cysteine sulfinic acid (C_p-SO₂H) or sulfonic acid (C_p-SO₃H). The C_p overoxidation is related to spectacular functional and structural switch in typical 2-Cys Prx. As mentioned before, when the typical 2-Cys Prx are in reduced state (C_p-S⁻), these proteins are decamers, but when are oxidized in disulfide, they can be dimers and/or decamers and are able to act as peroxidases (**Figure 5A and B**) [9, 11]. However, when the C_p is overoxidized, these enzymes are able to promote an intense oligomerization to form high-molecular-weight (HMW) spherical complexes (**Figure 5C**), with the concomitant inactivation of the peroxidase

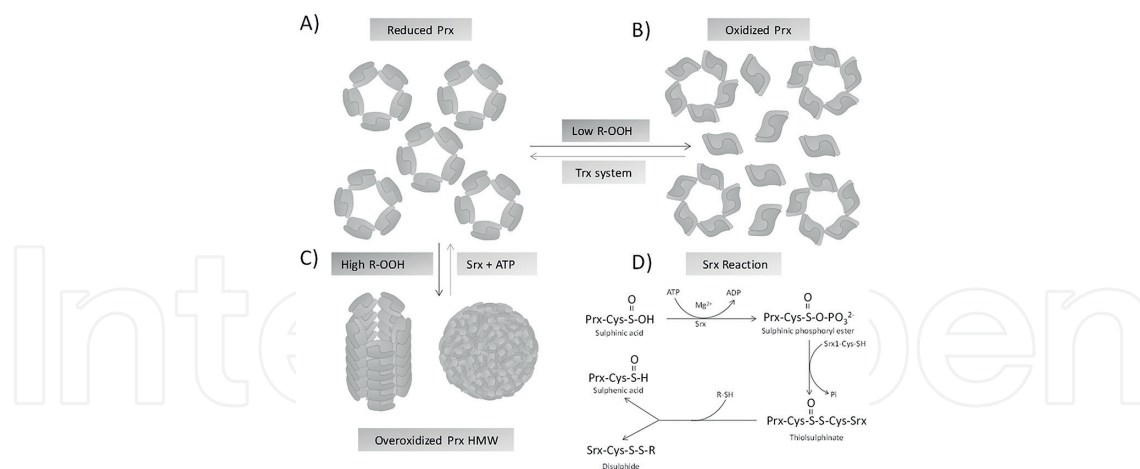


Figure 5. Typical 2-Cys Prx overoxidation and high-molecular-weight complex formation. The typical 2-Cys Prx in reduced form are presented as $\alpha_2(5)$ decamers (A). In low concentrations of hydroperoxides, the C_p is oxidized in C_p -SOH, and the intermolecular disulfide is formed with C_R . The disulfide formation, in some cases, is able to destabilize the decamers, forming a mixture of decamers and dimers (B). The oxidized form is reduced by Trx system. When the typical 2-Cys Prx are challenged with high concentrations of hydroperoxides, the C_p can be overoxidized to C_p -SO₂H. The C_p overoxidation promotes the HMW complexes formation which presents chaperone properties (C). The C_p -SO₂H can be reduced by sulfiredoxin, in ATP and Mg^{2+} dependent manner (D).

activity. The HMW complexes formation was first reported in *S. cerevisiae* Tsa1 and Tsa2 by Jang and coworkers [11], and, posteriorly, very similar complexes were described to the human homologues typical 2-Cys Prxs (PrxI and PrxII) [26]. Using transmission electron microscopy (TEM), it was demonstrated that complexes are represented by heterogeneous spherical structures, which can reach 1 GDa, and biochemical approaches revealed that the complexes present an extraordinary chaperone holdase activity [9, 26]. Later on, similar spherical and another type of HWM complexes, represented by the stacking of several decamers (**Figure 5C**), were described for the plant chloroplastic 2-Cys Prxs, cyanobacterial *Anabaena* PCC7120 2-Cys Prx, among others [27–30]. The structural differences between the HMW complexes are not well understood to date.

A very important point relies on the fact that the Prx overoxidized species cannot be reduced by the Trx system, but some studies revealed that overoxidized typical 2-Cys Prx species could be regenerated to the reduced form *in vivo* [31]. Posteriorly, it was identified in *S. cerevisiae*, and after in human and other species, an enzyme named sulfiredoxin (Srx) which is able to reduce the C_p -SO₂H in a ATP and Mg^{2+} dependent reaction, but not C_p -SO₃H, suggesting that this oxidation state is refractive to reduction [31]. Curiously, the C_p -SO₂H reduction rates by Srx are very slow when compared to the disulfide reduction by Trx ($\sim 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively) [32]. The biochemical steps of the C_p -SO₂H reduction by Srx are represented in **Figure 5D**. It is important to highlight that the Srx was identified in several eukaryotes, but few prokaryotes possess this enzyme, which may be an evolutionary sophistication of the 2-Cys Prx redox cycle [33]. In fact, to the majority of the prokaryotes, no homologous Srx gene was detected in their genomes, and the typical 2-Cys Prxs are much more resistant to overoxidation. Moreover, an additional classification can be done based on the C_p overoxidation susceptibility, and the 2-Cys Prx can be classified as sensitive or robust.

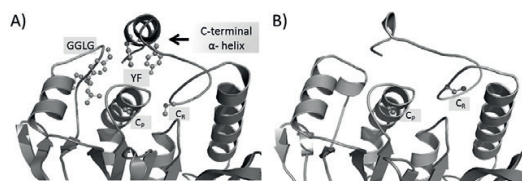


Figure 6. Structural comparison of the sensitive *S. cerevisiae* Tsa1 and the robust *S. typhimurium* AhpC. The comparison of Tsa1 (A) and AhpC (B) structures reveal the presence of the GGLG and YF motifs typically found in eukaryotes. The structures are represented in cartoon and the structural motifs as well the CP and CR are represented in ball and sticks. The figures were generated using the *S. cerevisiae* Tsa1 (PDB: 3SBC) and *S. typhimurium* AhpC (PDB: 4MA9) coordinates in Pymol software (<http://www.pymol.org/>).

The sensitive enzymes are present in eukaryotes and in some cyanobacteria, and the robust 2-Cys Prxs are exclusive to prokaryotes [34, 35]. The structural analyses of sensitive versus robust 2-Cys Prx revealed the presence of two motifs in the sensitive 2-Cys Prx. One is an insertion with conserved Gly-Gly-Leu-Gly, denominated GGLG motif (**Figure 6A**), and the other is an additional α -helix in C-terminal extension with a conserved Tyr-Phe sequence, the YF motif, both involved in C_p overoxidation susceptibility. **Figure 6** shows the comparison of *S. cerevisiae* Tsa1, a sensitive typical 2-Cys Prx, and *Salmonella typhimurium* (AhpC), a robust enzyme [34]. This difference is associated with important effects in redox cell signaling transduction and will be detailed in the next topics.

4. Typical 2-Cys Prx roles in redox signal transduction pathways

Increasing evidence shows the involvement of the typical 2-Cys Prx with the redox signal transduction pathways. Several antioxidant coding genes are activated by the transcriptional regulator activator protein 1 (AP1) which is considered as the major transcriptional activator of the antioxidant proteins in eukaryotes. It has been shown that the translocation of the homologue factor in budding yeast (YAP1) from cytosol to the nucleus may be controlled by 2-Cys Prx indirectly by the modulation of the cytosolic hydroperoxide levels [36]. In mammals, the PrxII is able to perform a physical interaction with the transcription factor STAT 3 (signal transducer and activator of transcription 3), which is able to activate the transcription of several genes involved in cell growth and apoptosis [37]. The authors demonstrated that PrxII can form mixed disulfides through C_p and cysteine residues of the DNA binding and trans-activating domains from STAT3, attenuating its transcriptional activity. Although the direct interaction of the typical 2-Cys Prx with target proteins is still an emerging area, this work reveals that the Prx may be an ultrasensitive hydroperoxide sensor that can form transient disulfides with unknown target proteins, which may have implications in biological processes. Additionally, the mammal PrxI can bind to several proteins including the tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN), protecting it against suppression of its lipid phosphatase activity, which occurs under oxidative stress. On the other hand, PTEN deficiency causes decrease of PrxI, PrxII, PrxV, and PrxVI, suggesting that the Prxs and PTEN act together to maintain cellular antioxidant levels and suppress cancer-promoting pathways, such as the PI3K-Akt pathway [38].

Despite the importance of the physical interaction between typical 2-Cys Prx and biological targets, the indirect role in the regulation of the cell-signaling redox pathways is dependent of an intricate balance between peroxiredoxin, thioredoxin, and sulfiredoxin levels and their redox state. As an example, in yeast, the number of Tsa1 molecules per cell is estimated in 378,000 in aerobic conditions (log phase, SD medium), while its reductants represented by Trx and Srx molecules are much lower (~13,000 and 538 molecules/cell, respectively) [16]. In the case of Trx enzymes, additionally to the Prx reduction, these enzymes are involved in several biological processes as deoxyribonucleotide synthesis, repair of oxidatively damaged proteins, protein folding, sulfur metabolism, and activation of transcription factors among others [16]. The importance of Tsa1 reduction by Trx in redox signaling promoted by hydrogen peroxide may be significant in the cells since it produces oxidized Trx, and many signal transduction pathways are only activated by the reduced Trx enzyme [1, 39]. Because the oxidation of Trx by hydroperoxidation is negligible, Prxs may act as a catalyst of this reaction in the cells [21].

The typical 2-Cys Prx inactivation by the C_p overoxidation combined with the low rates of the reduction of the C_p -SO₂H by sulfiredoxin ($\sim 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [32] is able to enhance levels of the reduced Trx to participate of other biological processes. In fact, it has been shown that the C_p overoxidation of the typical 2-Cys Prx from *Schizosaccharomyces pombe* (Tpx1) enhance the levels of the reduced Trx and allow the repair of damaged proteins increasing cell survival [40]. Accordingly, in mammals, only the reduced form of Trx is able to bind to the apoptosis signal regulating kinase (Ask-1), inhibiting the apoptosis, thus revealing a redox-dependent signal transduction pathway, which is induced by Trx oxidation [41]. Also in mammals, the activation of the nuclear factor kappa light chain enhancer of activated β cells (NF- κ B), a transcription factor that plays a central role regulating pathways of immune and inflammatory processes [42], is dependent on the reduction of a cysteine residue by Trx [43]. Additionally, Trx is involved in the reduction and activation of several transcription factors as the tumor-suppressor p53, the glucocorticoid and estrogen receptors, and c-Fos/c-Jun complexes [39].

Finally, the direct modulation of peroxides levels is an important role of the 2-Cys Prx enzymes in cell growth. It has been shown that PrxI and PrxII can eliminate the intracellular hydrogen peroxide generated by the receptors stimulation. Overexpression of PrxI and PrxII in culture cells dramatically reduces the intracellular hydrogen peroxide levels generated in response to platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), tiotropin (TSH), and TNF-related apoptosis inducing ligands (TRAIL). Furthermore, it has been shown that the expression of these proteins also led to a block of NF- κ B activity, which is induced by the extracellular addition of H₂O₂ or tumor necrosis factor α (TNF- α) [44]. It has also been shown that PrxII regulates different MAP kinases. Under stimulation of TNF, in which the activity of PrxII was blocked or partially abolished (knockout and RNAi), the activity of JNK and P38 MAP kinase was increased [45]. Due to the involvement of PrxI and PrxII in cell growth events, several studies have demonstrated that these isoforms have elevated levels in distinct types of cancers in different organs and tissues such as esophagus, pancreas, thyroid, lung, and breast [44–46]. The high expression of PrxI/PrxII is also associated to a more aggressive phenotype of cancer cells resistant to chemotherapy and radiotherapy [44–46].

Some authors argued that the typical 2-Cys Prx enzymes maintain hydrogen peroxide in appropriate levels to cell growth but not to apoptosis. However, Liu et al. [47] showed that the neoplastic cells of acute myeloid leukemia treated with an inhibitor of the PrxI and PrxII peroxidase activity demonstrated that the accumulation of intracellular H_2O_2 is related to the activation of the ERK1 and ERK2 (extracellular signal regulatory kinases). The kinases activation leads to an increase in the expression of the CCAAT-enhancer-binding proteins β (C/EBP β). This condition resulted in cell differentiation and consequent tumor regression [47, 48], showing additional complexity of the neoplastic processes with the involvement of the Prx. Since there is a notable resemblance between human and yeasts typical 2-Cys Prx as also other proteins of these pathways, yeasts may be used to explore these mechanisms.

5. Prx structural switch and circadian rhythm

The circadian rhythm is a fundamental process considered to be a feature of almost all living cells. The organisms are able to exhibit cycles in their metabolism, physiology, and behavior, even when isolated from external stimuli, maintaining a 24-h period [49]. However, the molecular mechanisms which drive the circadian rhythm are not simple to elucidate, since the already identified clock genes and proteins are not very conserved across phylogenetic kingdoms [49–53]. A common model for molecular mechanism has been described for all organisms which had their circadian rhythm investigated, named transcription-translation feedback loop (TTFL) [49]. However, the TTFL components are not shared between organisms, suggesting independent evolutionary processes. Additionally, it was showed that nontranscriptional mechanisms are sufficient to sustain circadian timekeeping in the eukaryotic lineage, although they normally function in conjunction with transcriptional components [51].

Recently, it has been demonstrated that in human erythrocytes, a cell type without transcriptional activity, the PrxI and PrxII exhibit an approximate 24-h rhythm according to the C_p overoxidation. This characteristic is shared with several organisms, including *S. cerevisiae*, indicating that the typical 2-Cys Prxs constitute a universal rhythmic biomarker [52]. To reach this conclusion, the authors performed immunoblotting analyses using a Prx C_p -SOH_{2/3} antibody and showed that 2-Cys Prx proteins from organisms of different domains have been oscillated to overoxidized Prx species, in constant conditions, exhibiting a circadian oscillation, probably reflecting an endogenous rhythm in the generation of reactive oxygen species (ROS; **Figure 7**) [51, 54–56]. Because all living organisms possess typical 2-Cys Prx enzymes that present remarkable conservation of the active site, the same antibody was able to detect overoxidized typical 2-Cys Prx in mice, fungi, plants, bacteria, and archaea. This indicates that the circadian clock mechanism is likely conserved across phylogenetic domains [54].

Yeast Tsa1 and Tsa2 isoforms exhibit relationship with the shorter period yeast respiratory oscillations, a cell-autonomous, temperature-compensated rhythm in oxygen consumption that synchronizes spontaneously when cells are grown at high density in aerobic, nutrient-limited, continuous culture [52]. Additionally, the yeast respiratory oscillation cycle shares

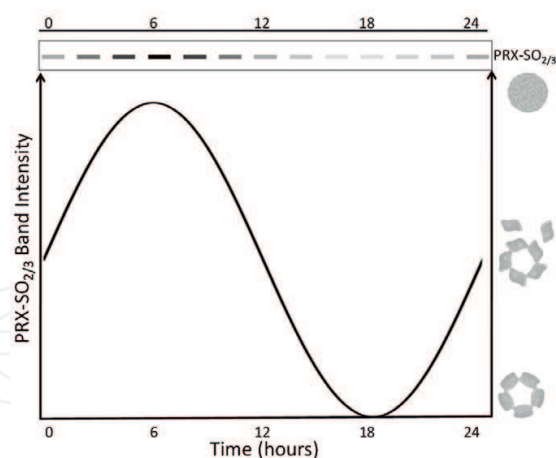


Figure 7. Redox circadian cycle of typical 2-Cys Prx. The circadian cycle of 2-Cys Prx could be detected by PRX-SO_{2/3} immunoblot. Western blot representation shows that overoxidized Prx has a circadian rhythm (upper part of the figure), and, consequently, the oligomeric state follows the redox state from Prx, alternating between dimers and decamers, in oxidative and reduced states, respectively, and HMW formation in overoxidized species (represented in the right side of the figure).

key features with the clock in mammalian cells, which may contribute to the elucidation about the origins of biological timekeeping [52].

Finally, it has been determined that the deregulation of the circadian rhythm is related to aging and genetic diseases [57]. Curiously, it has also been demonstrated that aging is related to the accumulation of the 2-Cys Prx overoxidized species in mammals [58]. Recently, a study involving the overoxidation of Tsa1 revealed that the chaperone activity detected in overoxidized species may be attributed to the association of this protein with the heat shock proteins Hsp70/Hsp104, revealing a pathway where the hydrogen peroxide is directly related to the aging process [12]. The authors also showed that the disaggregation process of the protein is dependent of Srx. Another study demonstrated that the presence of a mutant allele of Tsa1 resulted in accelerated aging in yeast [59]. One of the reasons for the involvement of these enzymes in the senescence process resides in the increase of the level of C_p overoxidation in Prx over time, even in the absence of oxidative stress [6]. In fact, this process also involves the caloric restriction, a well-known intervention that extends life span [60]. The caloric restriction elevates the level of Srx, which is responsible to reduce the hyperoxidized Tsa1, the inhibition of Tsa1 causes a profound genome instability, like chromosomal rearrangements and recombination, therefore increasing aging process [6, 61].

Another situation in which Prxs are involved is in the telomere length homeostasis [62]. The telomere dysfunction causes cellular senescence due to DNA damage [63]. The yeast mutant with *tsa1* gene deleted displayed reduction of telomere lengthening, which was not observed in conditions of low-oxidative exposure, probably due to the role of Tsa1 in hydroperoxide decomposition, avoiding DNA damage [62]. The understanding of the aging process and its implications in yeast can be used to extrapolate to higher eukaryotes. In fact, even in erythrocytes, the 2-Cys Prxs are related to the aging process. PrxII also has the ability to associate with the erythrocyte cell membrane through the N-terminal cytoplasmic domain of band 3

protein, after which PrxII undergoes a conformational change that does not entail the loss of its peroxidase function. This association may indicate a potential role of this Prx in the protection of membrane lipids against oxidative damage increasing life span [64]. Accordingly, a study carried out using mouse erythrocytes showed that the levels of overoxidized PrxII are due to autooxidation of hemoglobin and to PrxII degradation by the 20S proteasome. Approximately 1% of PrxII-SO₂H is degraded daily, leading to progressive loss of this enzyme which is directly related with the erythrocyte senescence [65]. Additionally, the aging process is directly related the genome instability. This instability is maintained in part by Prx action, and it is also involved in some diseases like cancer. Together, the data presented here reveal a cross talk of the 2-Cys Prx C_p overoxidation in circadian clocks, aging, and lifespan.

6. Methodologies to detect different redox species of the typical 2-Cys Prx

Several methodologies such as transmission electron microscopy (TEM), cryo-electron microscopy (Cryo-EM), size exclusion chromatography (SEC), mass spectrometry (MS), two-dimensional gel electrophoresis (2DGE), nonreducing SDS PAGE, and immunoblotting can be used to explore directly or indirectly the redox state of typical 2-Cys Prx [11, 66, 67]. However, for some experimental procedures, high-cost equipment and/or complex experimental procedures are necessary. Among these techniques, the nonreducing SDS PAGE, immunoblotting, and SEC are very good and cost-effective procedures, since no expensive equipment or complicated protocols are required. In this topic, these techniques and some experimental procedures will be discussed.

To access the formation of HMW complexes of purified 2-Cys Prx samples, the size exclusion chromatography (SEC) is the best choice. This methodology was used in the pioneer work performed by Jang and coworkers [11] using Tsa1 and Tsa2. In our lab, we performed a similar assay, using Tsa1, Trx system, and high concentration of cumene hydroperoxide (CHP) to promote the HMW complexes formation. Using SEC methodology, it is possible to separate several molecular species with mass range from ~45 kDa, correspondent to a dimer, followed by a ~200-kDa peak representing the decameric species, several oligomeric intermediates, and a prominent specie with more than 1000 kDa (**Figure 8**). These results are in accordance with structural analyses performed by transmission electron microscopy (TEM) by Jang and coworkers [11], using negative stain. These authors analyzed different fractions separated by SEC, and their results revealed three distinct oligomeric configurations: large spherical shaped particles, heterogeneous spherical particles, and ring-shaped structures, as represented in **Figure 8**. Currently, the cryo-electron microscopy development has provided pronounced advances to resolve complex protein structures in high resolution, such as the human Prx [67].

To reduced, oxidized, and overoxidized species from purified proteins samples *in vitro*, a simple nonreducing SDS PAGE (without DTT or another reductant) can be used to detect different redox species of the enzymes. In fact, the reduce Prx decamers and HMW complexes are held together by weak molecular forces as hydrophobic, van der Waals, and polar interactions, that are disrupted in SDS PAGE. As an example, on a nonreducing gel containing SDS,

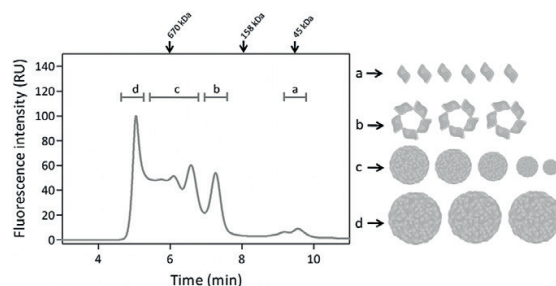


Figure 8. Overoxidized Tsa1 complexes analyzed by SEC. Tsa1 HMW species formation was analyzed by size-exclusion chromatography. The assay was performed overnight at 4°C in Hepes-NaOH 50mM (pH 7.4), DTPA 100 μM, sodium azide 1 mM, NADPH 1 mM, *S. cerevisiae* Prx 43.6 μM; *S. cerevisiae* Trx1 1 μM; *S. cerevisiae* TrxR1 0.3 μM and CHP 10 mM. The reaction was injected into the system containing a BioSep-SEC-S3000 column, eluted at a flow rate of 1 ml min⁻¹ and monitored by tryptophan fluorescence (excitation, 280 nm; emission, 340 nm). The elution profile of the molecular standards thyroglobulin (bovine) (670 kDa), γ-globulin (bovine) (158 kDa), and ovalbumin (chicken) (44 kDa) were used to identify the 2-Cys Prx oligomers.

the Tsa1 is detected as a monomer (~25 kDa). The oxidized form is detected as ~50 kDa bands (dimer) as a consequence of the intermolecular disulfide bond that is formed between the C_P and C_R that is not disrupted in the gel. The overoxidized forms (Cys_P-SO₂H or Cys_P-SO₃H) can also be visualized as monomers, since the disulfide bond formation is not achievable [68, 69] (**Figure 9A and B**).

Figure 9B shows the SDS-PAGE result of *in vitro* procedure to perform Tsa1 overoxidation using growing concentrations of organic hydroperoxide (*t*-BOOH) and the Trx system (see the legend for detail). In this example, it is possible to verify the presence of the Tsa1 overoxidized species when high concentrations of *t*-BOOH were used (**Figure 9B**, upper panel). In **Figure 9C**, it is represented the probable quaternary structure present in the correspondent lane of the gel. In low concentrations of hydroperoxides, there are, predominantly, reduced Tsa1 in decameric

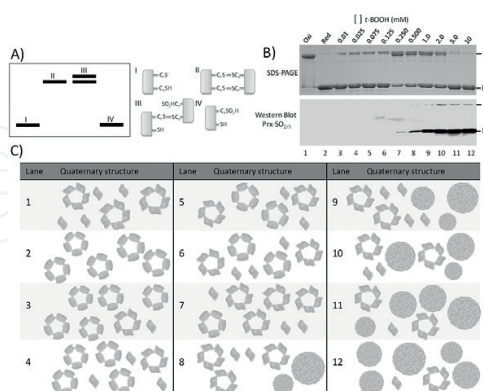


Figure 9. Redox state analyses by nonreducing SDS-PAGE and immunoblotting of the typical 2-Cys Prx. Diagram of the different 2-Cys Prx redox species in SDS-PAGE in nonreducing conditions by monomer or dimer formation (A). The Tsa1 overoxidation can be followed by SDS-PAGE in nonreducing conditions using *in vitro* approaches with Trx system in growing concentrations of hydroperoxides (B). In the example, the reaction was performed in a final volume of 50 μl at 30°C in Hepes-NaOH 50 mM (pH 7.0), DTPA 100 μM, sodium azide 1 mM, NADPH 150 μM, *S. cerevisiae* Tsa1 9.3 μM; *S. cerevisiae* Trx1 1 μM; *S. cerevisiae* TrxR1 0.3 μM and growing concentrations of *t*-BOOH (0.01, 0.025, 0.05, 0.75, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 5, and 10 mM). The C_P overoxidized species can be observed in higher concentrations of *t*-BOOH. The oxidative state of Tsa1 induces the quaternary structural changes (C). The numbers in C demonstrate the possible structure of Tsa1 in different oxidative states (dimers, reduced decamers, oxidized decamers, and HMW complexes).

form, which is disrupted in SDS PAGE. At intermediate hydroperoxide concentrations, disulfide oxidized forms are detected, being represented by dimers and weak decamers (**Figure 9C**), that are detected as dimers in SDS PAGE. However, in high concentration of hydroperoxide, C_p overoxidation and HMW structure formations that, in the gel, are detected as monomers occur [11] (**Figure 9B**). To confirm the redox state result, a western blot analysis can be performed using an anti-SO_{2/3} anti-body (**Figure 9B**, lower panel) [31, 70]. Additionally, the immunoblot technique can be used in nonpurified samples, as cell extracts, since antibodies to typical 2-Cys Prx are commercially available by several suppliers. Moreover, as mentioned before, the antibodies can be used in different species since the enzymes possess remarkable conservation [54].

7. Conclusions

S. cerevisiae is continuously used as a model organism by several researchers, being associated with significant advances in life sciences. In this chapter, we exposed several discoveries related with the role of the yeast Prx as a model in several studies related to hydroperoxide detoxification and signaling, and how these characteristics influence physiological processes like circadian rhythm and aging and diseases like cancer. All these features are related to the redox state of Prx and amazing functional and structural switches and the cross talk with different pathways that are regulated by hydroperoxide levels. Additionally, we present some practical approaches which can be easily implemented to Prx studies, like nonredox SDS-PAGE, size exclusion chromatography, and transmission electron microscopy. We believe that the use of these techniques may facilitate the study of these intricate enzymes for those interested in joining to this exciting research area.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo grants 07/50930-3, 16/10130-7, and 13/07937-8 (Redox Processes in Biomedicine [REDOXOMA]).

Author details

Melina C. Santos^{1,2}, Carlos A. Breyer¹, Leonardo Schultz¹, Karen S. Romanello³, Anderson F. Cunha³, Carlos A. Tairum Jr^{1,4} and Marcos Antonio de Oliveira^{1*}

*Address all correspondence to: mao@clp.unesp.br

1 Biosciences Institute, São Paulo State University, São Vicente, Brazil

2 Biochemical-Pharmaceutical Technology Department, University of São Paulo, Brazil

3 Genetics and Evolution Department, Federal University of São Carlos, Brazil

4 Institute of Biosciences of the University of São Paulo, Brazil

References

- [1] Netto LES, Antunes F. The roles of peroxiredoxin and thioredoxin in hydrogen peroxide sensing and in signal transduction. *Molecules and Cells*. 2016;**39**:65-71. DOI: 10.14348/molcells.2016.2349
- [2] Rhee SG. Overview on peroxiredoxin. *Molecules and Cells*. 2016;**39**:1-5. DOI: 10.14348/molcells.2016.2368
- [3] Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003;**15**:247-254. DOI: 10.1016/S0955-0674(03)00002-4
- [4] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press; 2015.
- [5] Kang SW, Rhee SG, Chang T-S, Jeong W, Choi MH. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: Therapeutic implications. *Trends in Molecular Medicine*. 2005;**11**:571-578. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.10.006
- [6] Molin M, Yang J, Hanzén S, Toledano MB, Labarre J, Nyström T. Life span extension and H₂O₂ resistance elicited by caloric restriction require the peroxiredoxin Tsa1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*. 2011;**43**:823-833. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.07.027
- [7] Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayté J, Toledano MB, Hidalgo E. A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;**102**:8875-8880. DOI: 10.1073/pnas.0503251102
- [8] Adimora NJ, Jones DP, Kemp ML. A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2010;**13**:731-743. DOI: 10.1089/ars.2009.2968
- [9] Perkins A, Nelson KJ, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxins: Guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends in Biochemical Sciences*. 2015;**40**:435-445. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.05.001
- [10] Tairum CA, Santos MC, Breyer CA, Geyer RR, Nieves CJ, Portillo-Ledesma S, Ferrer-Sueta G, Toledo JC, Toyama MH, Augusto O, Netto LES, de Oliveira MA. Catalytic Thr or Ser residue modulates structural switches in 2-cys peroxiredoxin by distinct mechanisms. *Scientific Reports*. 2016;**6**:33133. DOI: 10.1038/srep33133
- [11] Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW, Choi YO, Kim WY, Kang JS, Cheong GW, Yun DJ, Rhee SG, Cho MJ, Lee SY. Two enzymes in one: Two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*. 2004;**117**:625-635. DOI: 10.1016/j.cell.2004.05.002

- [12] Hanzén S, Vielfort K, Yang J, Roger F, Andersson V, Zamarbide-Forés S, Andersson R, Malm L, Palais G, Biteau B, Liu B, Toledano MBB, Molin M, Nyström T. Lifespan control by redox-dependent recruitment of chaperones to misfolded proteins. *Cell*. 2016;**166**:140-151. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.006
- [13] Chae HZ, Kim IH, Kim K, Rhee SG. Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;**268**:16815-16821
- [14] Park SG, Cha MK, Jeong W, Kim IH. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;**275**:5723-5732
- [15] Pedrajas JR, Miranda-Vizueté A, Javanmardy N, Gustafsson JA, Spyrou G. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thio-redoxin peroxidase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;**275**:16296-16301. DOI: 10.1074/jbc.275.21.16296
- [16] Ghaemmighami S, Huh W, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 2003;**425**:737-741. DOI: 10.1038/nature02046
- [17] Low FM, Hampton MB, Winterbourn CC. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2008;**10**:1621-1630 DOI: 10.1089/ars.2008.2081
- [18] Horta BB, Oliveira MA, Discola KF, Cussiol JRR, Netto LES. Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qbeta from *Xylella fastidiosa*: Catalytic mechanism and high reactivity. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;**285**:16051-16065. DOI: 10.1074/jbc.M109.094839
- [19] Toledo JC, Audi R, Ogusucu R, Monteiro G, Netto LES, Augusto O. Horseradish peroxidase compound i as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: From quantification to kinetics. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;**50**:1032-1038. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.020
- [20] Reyes AM, Hugo M, Trostchansky A, Capece L, Radi R, Trujillo M. Oxidizing substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: Kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;**51**:464-473. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.023
- [21] Tairum CA, de Oliveira MA, Horta BB, Zara FJ, Netto LES. Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: Requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thio-redoxin. *Journal of Molecular Biology*. 2012;**424**:28-41. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.09.008
- [22] Flohé L, Harris JR. Introduction. History of the peroxiredoxins and topical perspectives. *Subcellular Biochemistry*. 2007;**44**:1-25

- [23] Flohé L, Toppo S, Cozza G, Ursini F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2011;**15**:763-780. DOI: 10.1089/ars.2010.3397
- [24] Hall A, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA. Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *Journal of Molecular Biology*. 2010;**402**:194-209. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.07.022
- [25] Netto LES, de Oliveira MA, Tairum CA, da Silva Neto JF. Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. *Free Radical Research*. 2016;**50**:206-245. DOI: 10.3109/10715762.2015.1120864
- [26] Moon JC, Hah Y-S, Kim WY, Jung BG, Jang HH, Lee JR, Kim SY, Lee YM, Jeon MG, Kim CW, Cho MJ, Lee SY. Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;**280**:28775-28784. DOI: 10.1074/jbc.M505362200
- [27] Toledano MB, Huang B. Microbial 2-Cys peroxiredoxins: Insights into their complex physiological roles. *Molecules and Cells*. 2016;**39**:31-39. DOI: 10.14348/molcells.2016.2326
- [28] Banerjee M, Chakravarty D, Ballal A. Redox-dependent chaperone/peroxidase function of 2-Cys-Prx from the cyanobacterium *Anabaena* PCC7120: Role in oxidative stress tolerance. *BMC Plant Biology*. 2015;**15**:60. DOI: 10.1186/s12870-015-0444-2
- [29] König J, Galliardt H, Jütte P, Schäper S, Dittmann L, Dietz K-J. The conformational bases for the two functionalities of 2-cysteine peroxiredoxins as peroxidase and chaperone. *Journal of Experimental Botany*. 2013;**64**:3483-3497. DOI: 10.1093/jxb/ert184
- [30] Pan Y, Jin J-H, Yu Y, Wang J. Significant enhancement of hPrx1 chaperone activity through lysine acetylation. *Chembiochem*. 2014;**15**:1773-1776. DOI: 10.1002/cbic.201402164
- [31] Biteau B, Labarre J, Toledano MB. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*. 2003;**425**:980-984. DOI: 10.1038/nature02075
- [32] Mishra M, Jiang H, Wu L, Chawsheen HA, Wei Q. The sulfiredoxin-peroxiredoxin (Srx-Prx) axis in cell signal transduction and cancer development. *Cancer Letters*. 2015;**366**:150-159. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.002
- [33] Wood Z, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*. 2003;**300**:650-653. DOI: 10.1126/science.1080405
- [34] Wood ZA, Schro E, Harris JR, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*. 2003;**28**:00003-00008
- [35] Pascual MB, Mata-cabana A, Florencio FJ, Lindahl M, Cejudo FJ. Overoxidation of 2-Cys peroxiredoxin in prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;**285**:34485-34492. DOI: 10.1074/jbc.M110.160465
- [36] Tachibana T, Okazaki S, Murayama A, Naganuma A, Nomoto A, Kuge S. A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;**284**:4464-4472. DOI: 10.1074/jbc.M807583200

- [37] Sobotta MC, Liou W, Stöcker S, Talwar D, Oehler M, Ruppert T, Scharf AND, Dick TP. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nature Chemical Biology*. 2015;**11**:64-70. DOI: 10.1038/nchembio.1695
- [38] Cao J, Schulte J, Knight A, Leslie NR, Zagozdzon A, Bronson R, Manevich Y, Beeson C, Neumann CA. Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. *EMBO Journal*. 2009;**28**:1505-1517. DOI: 10.1038/emboj.2009.101
- [39] Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: Implications for diseases in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 2007;**292**:H1227-H1236. DOI: 10.1152/ajpheart.01162.2006
- [40] Day AM, Brown JD, Taylor SR, Rand JD, Morgan BA, Veal EA. Article Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. *Molecular Cell*. 2012;**45**:398-408. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.11.027
- [41] Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO Journal*. 1998;**17**:2596-2606. DOI: 10.1093/emboj/17.9.2596
- [42] Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-κB signaling. *Annual Review of Biophysics*. 2013;**42**:443-468. DOI: 10.1146/annurev-biophys-083012-130338
- [43] Matthews JR, Wakasugi N, Virelizier JL, Yodoi J, Hay RT. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Research*. 1992;**20**:3821-3830
- [44] Lee JY, Jung HJ, Song IS, Williams MS, Choi C, Rhee SG, Kim J, Kang SW. Protective role of cytosolic 2-cys peroxiredoxin in the TNF-alpha-induced apoptotic death of human cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;**47**:1162-1171. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.027
- [45] Choi MH, Lee IK, Kim GW, Kim BU, Han Y-H, Yu D-Y, Park HS, Kim KY, Lee JS, Choi C, Bae YS, Lee BI, Rhee SG, Kang SW. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature*. 2005;**435**:347-353. DOI: 10.1038/nature03587
- [46] Miki H, Funato Y. Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. *Journal of Biochemistry*. 2012;**151**:255-261. DOI: 10.1093/jb/mvs006
- [47] Liu C-X, Yin Q-Q, Zhou H-C, Wu Y-L, Pu J-X, Xia L, Liu W, Huang X, Jiang T, Wu M-X, He L-C, Zhao Y-X, Wang X-L, Xiao W-L, Chen H-Z, Zhao Q, Zhou A-W, Wang L-S, Sun H-D, Chen G-Q. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. *Nature Chemical Biology*. 2012;**8**:486-493. DOI: 10.1038/nchembio.935
- [48] Liu C-X, Zhou H-C, Yin Q-Q, Wu Y-L, Chen G-Q. Targeting peroxiredoxins against leukemia. *Experimental Cell Research*. 2013;**319**:170-176. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.06.013
- [49] Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999;**96**:271-290. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80566-8

- [50] Woelfle MA, Ouyang Y, Phanvijhitsiri K, Johnson CH. The adaptive value of circadian clocks: An experimental assessment in Cyanobacteria. *Current Biology*. 2004;**14**:1481-1486. DOI: 10.1016/j.cub.2004.08.023
- [51] O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, Troein C, Corellou F, Bouget F-Y, Reddy AB, Millar AJ. Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature*. 2011;**469**:554-558. DOI: 10.1038/nature09654
- [52] Causton HC, Feeney KA, Ziegler CA, O'Neill JS. Metabolic cycles in yeast share features conserved among circadian rhythms. *Current Biology*. 2015;**25**:1056-1062. DOI: 10.1016/j.cub.2015.02.035
- [53] Wijnen H, Young MW. Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annual Review of Genetics*. 2006;**40**:409-448. DOI: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090603
- [54] Edgar RS, Green EW, Zhao Y, van Ooijen G, Olmedo M, Qin X, Xu Y, Pan M, Valekunja UK, Feeney KA, Maywood ES, Hastings MH, Baliga NS, Merrow M, Millar AJ, Johnson CH, Kyriacou CP, O'Neill JS, Reddy AB. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature*. 2012;**485**:459-464. DOI: 10.1038/nature11088
- [55] Hoyle NP, O'Neill JS. Oxidation-reduction cycles of peroxiredoxin proteins and non-transcriptional aspects of timekeeping. *Biochemistry*. 2015;**54**:184-193. DOI: 10.1021/bi5008386
- [56] O'Neill JS, Reddy AB. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature*. 2011;**469**:498-503. DOI: 10.1038/nature09702
- [57] Fonseca Costa SS, Ripperger JA. Impact of the circadian clock on the aging process. *Frontiers in Neurology*. 2015;**6**:1-5. DOI: 10.3389/fneur.2015.00043
- [58] Nyström T, Yang J, Molin M. Peroxiredoxins, gerontogenes linking aging to genome instability and cancer. *Genes and Development*. 2012;**26**:2001-2008. DOI: 10.1101/gad.200006.112
- [59] Timmermann B, Jarolim S, Rußmayer H, Kerick M, Michel S, Krüger A, Bluemlein K, Laun P, Grillari J, Lehrach H, Breitenbach M, Ralser M. A new dominant peroxiredoxin allele identified by whole-genome re-sequencing of random mutagenized yeast causes oxidant-resistance and premature aging. *Aging (Albany NY)*. 2010;**2**:475-486. DOI: 10.18632/aging.100187
- [60] Kaeberlein M, Hu D, Kerr EO, Tsuchiya M, Westman EA, Dang N, Fields S, Kennedy BK. Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *PLoS Genetics*. 2005;**1**:e69. DOI: 10.1371/journal.pgen.0010069
- [61] Huang M-E, Kolodner RD. A biological network in *Saccharomyces cerevisiae* prevents the deleterious effects of endogenous oxidative DNA damage. *Molecular Cell*. 2005;**17**:709-720. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.02.008
- [62] Lu J, Vallabhaneni H, Yin J, Liu Y. Deletion of the major peroxiredoxin Tsa1 alters telomere length homeostasis. *Aging Cell*. 2013;**12**:635-644. DOI: 10.1111/accel.12085

- [63] de Lange T. How shelterin solves the telomere end-protection problem. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2010;**75**:167-177. DOI: 10.1101/sqb.2010.75.017
- [64] Matte A, Bertoldi M, Mohandas N, An X, Bugatti A, Brunati AM, Rusnati M, Tibaldi E, Siciliano A, Turrini F, Perrotta S, De Franceschi L. Membrane association of peroxiredoxin-2 in red cells is mediated by the N-terminal cytoplasmic domain of band 3. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013;**55**:27-35. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.543
- [65] Cho C-S, Yoon HJ, Kim JY, Woo HA, Rhee SG. Circadian rhythm of hyperoxidized peroxiredoxin II is determined by hemoglobin autoxidation and the 20S proteasome in red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;**111**:12043-12048. DOI: 10.1073/pnas.1401100111
- [66] Saccoccia F, Di Micco P, Boumis G, Brunori M, Koutris I, Miele AE, Morea V, Sriratana P, Williams DL, Bellelli A, Angelucci F. Moonlighting by different stressors: Crystal structure of the chaperone species of a 2-Cys peroxiredoxin. *Structure*. 2012;**20**:429-439. DOI: 10.1016/j.str.2012.01.004
- [67] Radjainia M, Venugopal H, Desfosses A, Phillips AJ, Yewdall NA, Hampton MB, Gerrard JA, Mitra AK. Cryo-electron microscopy structure of human peroxiredoxin-3 filament reveals the assembly of a putative chaperone. *Structure*. 2015;**23**:912-920. DOI: 10.1016/j.str.2015.03.019
- [68] Nelson KJ, Parsonage D, Karplus PA, Poole LB. Evaluating peroxiredoxin sensitivity toward inactivation by peroxide substrates. *Methods in Enzymology*. 2013;**527**:21-40. DOI: 10.1016/B978-0-12-405882-8.00002-7
- [69] Cox AG, Pearson AG, Pullar JM, Onsson TJJ, Lowther WT, Winterbourn CC, Hampton MB. Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins. *Movie*. 2009;**58**:51-58. DOI: 10.1042/BJ20090242
- [70] Woo HA, Kang SW, Kim HK, Yang KS, Chae HZ, Rhee SG. Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid: Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;**278**:47361-47364. DOI: 10.1074/jbc.C300428200

Apêndice E

Feio, W. A.; Schultz, L.; Breyer, C. A.; Toyama, M. H.; Pessoa-Jr, A. Monteiro, G.; de Oliveira, M. A. Functional and Structural Evaluation of The Antileukemic Enzyme L-Asparaginase Expressed by Different *Escherichia coli* Strains. Artigo será submetido ao *Journal of Microbiology and Biotechnology*.

Functional and Structural Evaluation of The Antileukemic Enzyme L-Asparaginase Expressed by Different *Escherichia coli* Strains

Werner Alfinito Feio¹, Leonardo Schultz¹, Carlos Alexandre Breyer¹, Marcos Hikari Toyama¹, Adalberto Pessoa-Jr², Gisele Monteiro² and Marcos Antonio de Oliveira^{1*}

¹São Paulo State University (UNESP), Coastal Campus, Institute of Biosciences, São Vicente, São Paulo, Brazil, 11330-900.

²University of São Paulo, Biochemical-Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-000

*Contact: Marcos A. de Oliveira, phone: 55-13-3569-7108, FAX: 55-13-3569-9446, marcos.a.oliveira@unesp.br

Abstract

The acute lymphoblastic leukemia (ALL) affects lymphoblastic cells and is the most common neoplasm during childhood. Among the pharmaceuticals used in the treatment protocols for ALL, the L-Asparaginase (ASNase) from *Escherichia coli* (EcA) is an essential biodrug. Meanwhile, the use of EcA in neoplastic treatments causes several side effects, such as immunological reactions, hepatotoxicity, neurotoxicity, depression, and coagulation abnormalities, among others. Commercial EcA is expressed as a recombinant protein, as so novel enzymes from different organisms; in fact, the EcA is a tetrameric enzyme with high molecular weight (140kDa) and its overexpression in recombinant systems often results in cell death or the production of aggregated or inactive enzymes. On the other hand, are several commercial expression strains that aims to overcome expression issues, but no work has performed a systematic evaluation of the *E. coli* strains aiming to express recombinant asparaginases, to date. In this study, we have evaluated eleven expression strains with different characteristics to determinate which is the most appropriate for asparaginase expression, using the recombinant wild type EcA (rEcA) as a prototype enzyme and assessing the secondary structure content, oligomeric state, aggregation and specific activity of the enzymes. Structural analysis suggests that a correctly folded rEcA was obtained using ArcticExpress (DE3), a strain that co-express chaperonins, while all others produced poorly folded proteins. Additionally, the enzymatic assays show high specific activity by proteins expressed by ArcticExpress (DE3) when compared to the other strains used in this work. Together our results indicate that structural analysis is essential to express recombinant proteins.

Keywords: *Escherichia coli* asparaginase (EcA); Acute Lymphoblastic Leukemia; Recombinant Enzymes; Functional and Structural Evaluation.

Introduction

The *Escherichia coli* asparaginase (EcA) is an essential biopharmaceutical used on therapeutic protocols for the treatment of the Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in children. ALL is the most common haematological neoplasm in infants, mainly affecting kids between 3 and 5 years of age (Avramis 2012; Lopes et al. 2017). It is characterized by the accumulation of immature and inactive lymphoblastic cells (lymphoblasts). The extensive production of these immature cells renders the bone marrow incapable of producing healthy cells amounts, causing several complications that can lead to death (Hunger and Mullighan. 2015; Kansagra et al., 2018). Unlike other cellular types, ALL cells are unable to produce L-asparagine in adequate levels, relying exclusively in extracellular sources (Keating et al. 1993). The administration of L-Asparaginase from *E. coli*, which hydrolyzes L-asparagine (Asn) into aspartic acid (Asp) and ammonia, leads to a drastic reduction of Asn on bloodstream; this reduction compromises the nucleic acids and protein metabolism of tumor cells, which results in apoptosis (Figure 1) (Story et al. 1993; Jarrar et al. 2006; Mehta et al. 2014).

EcA is a high molecular mass (~148 kDa) periplasmic enzyme that is physiologically found as a homotetramer, where each subunit has ~37 kDa (Figure 1). The active site is located on the interface between dimers and the correct folding is not only essential for its full biological activity, but also to mitigate immunological responses (Swain et al. 1993; Palm et al. 1996; Michalska and Jaskolski 2006; Pieters et al. 2008). Nonetheless, despite its high efficiency, EcA can generate adverse effects such as immunological reactions, while several other side effects, like hepatotoxicity, neurotoxicity, coagulation abnormalities, nausea, vomiting, peripheral edema, hypoalbuminemia, pancreatitis, immunological responses, among

others are also related to clinical treatment (Banerji 2015; Wolthers et al. 2017). In fact, several side effects have been associated with the secondary glutaminase (GLNase) activity of EcA and the presence of protein aggregates in the formulations (Kafkewitz and Bendich 1983; Lopes et al. 2017).

Several efforts have been made to modify EcA or discover new enzymes from other organisms possessing enhanced properties when compared to the one from *E. coli* in order to overcome these undesirable adverse effects. The chemical modification of EcA by the conjugation of polyethylene glycol molecules (PEGylation) attached to ϵ -amino groups of the lysine residues, was developed in 1970's and, since the early 1980-90's, pegylated EcA has been used for the treatment of ALL in patients that are hypersensitive to native formulation (Graham 2003; Narta et al. 2007). However, immunological responses to PEG and hypertriglyceridemia have been reported in some patients treated with pegylated EcA (Armstrong et al. 2007; Galindo et al. 2016). Additionally, protein engineering efforts are being made to modify the enzymes aiming to reduce or abolish the GLNase activity, enhance its stability and decrease the immunogenic properties of the enzyme (Patel et al. 2009; Nguyen et al. 2018). ASNases from several biological sources have been characterized in the past years in a search for new enzymes with superior characteristics (Kotzia and Labrou 2007; Cappelletti et al. 2008; Amena et al. 2010; Oza et al. 2011; Pourhossein and Korbekandi 2014; Huang et al. 2014; Schalk and Lavie 2014; Mahajan et al. 2014; Han et al. 2014; Costa et al. 2016; Ghasemi et al. 2017; Saeed et al. 2018; Radha et al. 2018; Arjun et al. 2018; Sindhu and Manonmani 2018). Despite the fact that most asparaginases homologues to EcA are periplasmic enzymes involved in nitrogen absorption from substrates, the recombinant enzymes are frequently expressed in the cytosol of *E. coli* strains,

mainly due to the simplicity of purification when compared to periplasmic expression (Kotzia et al. 2007; Cappelletti et al. 2008; Oza et al. 2011; Huang et al. 2014; Schalk and Lavie 2014; Han et al. 2014; Meena et al. 2016; Costa et al. 2016; Saeed et al. 2018; Radha et al. 2018; Sindhu and Manonmani 2018).

The most used method for characterization of engineered or novel ASNases is the overexpression of the enzymes in *E. coli* expression systems using recombinant approaches. Actually, the wild type EcA (non-PEGylated form) is also now produced recombinantly by Medac® (Spectrila®) (Pieters et al. 2008; van der Sluis et al. 2013; Völler et al. 2018), since the native enzyme extraction protocols are considered outdated and present low yields when compared with recombinant ones (Pieters et al. 2008). In fact, nowadays several *E. coli* strains derived from BL21 (DE3) that possess different characteristics aiming to enhance the protein expression are commercially available. The strains present modifications as the co-expression of chaperonins (ArcticExpress (DE3) and GroEL (DE3)), tight control of the expression (Turner (DE3); pLysS (DE3); and Lemo21 (DE3)), or prooxidant cytosol environment (Origami B (DE3) and SHuffle (DE3)), specialization to express toxic proteins (C43 (DE3)) among others specific characteristics. Despite the high commercial interest involving ASNases, a systematic comparative study with different *E. coli* expression strains aiming to assess the best one for its expression/activity and folding, has never been performed. In fact, only a few strains have been used for enzyme production, with the prevalence of BL21 (DE3) (Oza et al. 2011; Roth et al. 2013; Pourhossein and Korbekandi 2014; Upadhyay et al. 2014), making this research field a promising one.

In this study, we have evaluated eleven *E. coli* expression strains with different characteristics, in order to determine which one is the most appropriate for

asparaginase expression using the recombinant wild type EcA (rEcA) containing a His tag as a prototype enzyme. We have assessed the purity after chromatographic protocols (Immobilized-metal affinity chromatography - IMAC), performed structural analysis employing circular dichroism spectroscopy (CD) and size exclusion chromatography (SEC) to evaluate protein folding as well as quaternary structure and determined the ASNase activity. Among the strains tested, *E. coli* BL21 ArcticExpress (DE3) presented the best results, similar to the commercial enzyme. It presented a low content of protein aggregates, correct folding and higher specific activity (156 U/mg), indicating that *E. coli* BL21 ArcticExpress (DE3) is a good choice of strain to express recombinant ASNases.

Materials and Methods

Chemicals - All chemicals were of analytical grade purity and were purchased from Sigma-Aldrich (USA).

Microbiological culture media - The culture media used for bacterial expression was LB (1% triptone; 0.5% yeast extract; 0.5% NaCl), while SOC (2% triptone; 0.5% yeast extract; 0.058% NaCl; 0.018% KCl; final [glucose] of 20 mM; pH: 7.0) was used for cell recovery after electroporation. Solid media were obtained by adding 2% bacteriological agar.

Gene cloning and bacterial transformation - The *asnB* gene, which encodes the EcA enzyme, was synthesized by GenScript as a codon-optimized sequence for *E. coli* expression without the first 66 nucleotides (signal peptide to periplasm) (GenScript Corporation) and then cloned into pET15b vector between the sites *Nde* I and *Bam* HI (pET15b/*asnB*). The gene integrity was verified by DNA sequencing and the synthetic *asnB* sequence was stored at the NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) under the accession number HM367071. The bacteria transformation by electroporation were performed as described by Ausubel et al. (2003).

Bacterial expression strains - The strains characteristics, selection marker(s), advantages and manufacturer/source are presented in table 1.

rEcA expression on bacterial strains - Since that the pET15b confers resistance to ampicillin (amp), the *E. coli* strains carrying the pET15b/*asnB* plasmid were cultivated on 10 mL of LB/amp media (ampicillin = 100 µg/mL) for 16 hours at 37°C and 250 rpm. Additionally, another antibiotic was supplemented to the culture

(chloramphenicol = 34 µg/mL; kanamycin = 30 µg/mL; streptomycin = 25 µg/mL; tetracycline = 15 µg/mL; or gentamicin = 20 µg/mL) according with strain used (Table 1). Then 10 mL of each culture was then transferred to a flask containing 0.5 L of fresh LB/antibiotic(s) and cells were cultured at 37°C/250 rpm until the OD₆₀₀ reached 0.6–0.8. At this point, the expression of the rECAs were then induced by the addition of IPTG to the final concentration of 0.3 mM and cultures were maintained at 16 °C for 16 hours at 250 rpm. After expression, cells were harvested by centrifugation for 20 minutes at 4 °C/4000 g and the supernatant discarded.

Cellular lysis and IMAC purification of rEcA - The cells were suspended in start buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4. The cells were lysed by 5 cycles of 30 seconds sonication at 30% amplitude in ice bath and then treated with streptomycin sulfate (final concentration = 1 %) for 30 minutes to remove nucleic acids (final concentration = 1 %). The His-tagged rECAs expressed in different strains were purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) on Hi-Trap columns (GE Healthcare, Piscataway, USA) using imidazole gradient (5-500 mM). The imidazole excess was removed from purified proteins by gel filtration using Hi-Trap desalting columns (GE Healthcare, Piscataway, USA). Purified proteins were stored in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 50 mM sodium chloride at 4 °C until further use but for not more than one week.

Protein quantification - The purified ASNases were quantified on spectrophotometer based on enzyme molar extinction coefficient (23.505 M⁻¹ cm⁻¹), determined using the amino acid sequence by the program Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Each experiment was performed at least three times.

Circular dichroism spectroscopy (CD) - The CD spectra of the recombinant ASNases were obtained using a 0.1 cm path length cuvette containing 3 μ M of protein sample in 10 mM Tris buffer (pH: 7.4). The assays were carried out in a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco Inc., Tokyo, Japan). Spectra were presented as an average of eight scans recorded from 190 to 260 nm. The content of secondary structures in each protein was estimated using the CDNN 2.1 software (ACGT Progenomics AG, Halle, Germany).

Size exclusion chromatography (SEC) - Size exclusion chromatography was performed by analytical HPLC (Jasco LC-2000 Plus) equipped with a PU 2880 Plus injector and a PDA MD 2018 detector (Jasco Inc., Tokyo, Japan), as previously described (Tairum et al. 2016). The samples (at concentration of 1 mg/mL in 100 mM of Tris-HCl (pH = 7.4) and 100 mM of NaCl) were resolved by a system containing SEC-S3000 column (7.8 $\times$ 300 mm, 5 cm, separation range of 5 to 700 kDa) (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) at a flow of 1 mL $\times$ s⁻¹ in 100 mM Tris-HCl (pH = 7.4) and 100 mM NaCl. The molecular weight standards employed in SEC experiments were bovine γ globulin (158 kDa), chicken ovalbumin (44 kDa) and horse myoglobin (17 kDa) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). The chromatograms were analyzed using the Jasco LC-2000 Plus (Jasco Inc., Tokyo, Japan). The experiments were performed at least three times in triplicate

Specific activity assay through Nessler method - To determine the specific activity of the recombinant EcA, (rEcA) the amount of produced ammonia on the catalyzed hydrolysis of Asn was measured. The reaction containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 44 mM L-Asn and growing concentrations of rEcA (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.6 and 3.2 μ g) were incubated at 37 °C for 20 minutes; the enzymatic reactions were stopped by adding trichloroacetic acid (TCA) at a final concentration of 0.3 M. The

reactions were then diluted 10-fold on Tris-HCl 50 mM (pH = 7.4) and Nessler reagent was added. Data were analyzed at $\lambda = 440$ nm on Cary 60 UV-Vis spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The standard curve was constructed using ammonium sulfate gradient (0 - 20 $\mu\text{mol/mL}$). All experiments were performed at least three times to each protein in triplicate.

Statistical Analysis - All analyses were performed in, at least, triplicate. Results were represented as mean $\pm$ standard deviation (SD) using GraphPad Prism version 6.05 software (GraphPad Prism Software, San Diego, USA).

Results

Recombinant EcA expression - The *asnB* gene lacking the periplasm addressing sequence was cloned into a pET15b vector and was used to transform eleven *E. coli* strains by electroporation. To avoid the formation of inclusion bodies, we used low temperatures to induce protein expression (16°C), as it is known to decrease aggregation by slowing protein synthesis and diminishing hydrophobic interactions between the recently synthesized polypeptide chains (Schein and Nøtberg 1988; San-Miguel et al. 2013; Rosano and Ceccarelli 2014). Initially, we aimed to determine the yields of the rEcA production in each bacterial strain. However, applying the same protocol for mechanical disruption (sonication) for all the lineages was clear that a differential cell disruption occurred, which may have lead to artefactual results. In order to overcome this situation, we also performed cell disruption using chemical agents. Nonetheless, the turbidity of the cell suspensions indicated differences in the efficiency of cellular disruption despite application of the same protocols. Our results revealed that each strain presents different susceptibilities to cell disruption and the protocol of cell disruption must be optimized depending on the strain choice to express a recombinant protein. Since both methods produced different total protein content and our interests relies on the comparative rEcA analysis of purified enzymes produced by different strains, we chose sonication as the standard method for cellular rupture, applying the same conditions to all strains, since that to the analytical approaches equal amounts of the recombinant pure enzymes are used.

Our results reveals that the amounts of purified rEcA was higher as follow:
BL21 (DE3), 14.25 mg $\pm$ 1.32 > SHuffle (DE3), 8.02 $\pm$ 2.91 mg > C43 (DE3), 7.08 mg $\pm$ 2.43 mg > Tuner (DE3), 6.76 $\pm$ 0.25 mg > Crystal (DE3), 5.36 mg $\pm$ 1.75 mg >

GroEL (DE3) $6.39 \text{ mg} \pm 0.39$ > Lemo21 (DE3), $4.63 \pm 2.41 \text{ mg}$ > ArcticExpress (DE3), $4.44 \text{ mg} \pm 0.99 \text{ mg}$ > pLysS (DE3), $3.10 \pm 0.14 \text{ mg}$. The statistical analysis of the results revealed the no significant differences of the rEcA amounts obtained in the strains ArcticExpress (DE3), Crystal (DE3), GroEL (DE3), Lemo21 (DE3) and SHuffle (DE3) ($\sim 4.44 \text{ mg} \pm 0.99 \text{ mg}$). The best results were obtained using BL21 (DE3) ($14.25 \text{ mg} \pm 1.32$) and Tuner (DE3) ($6.76 \pm 0.25 \text{ mg}$) and the strain pLysS produced the lower amounts among the strains tested in this work. To the Rosetta (DE3) and Origami B (DE3) no protein was obtained. The characteristic of Rosetta (DE3) is the expression of RNA transporters for mammal codons, not commonly found in bacteria. Therefore, the use of the Rosetta (DE3) strain aimed to decrease protein synthesis in order to obtain correctly folded enzymes, although this strategy was not successful. The Origami B (DE3) was also inefficient to EcA expression for unknown reasons. Despite that the *E. coli* strains BL21 (DE3) and Tuner (DE3) were able to produce large amounts of the rEcA, the quantity does not guarantee a properly folded protein which can ultimately lead to dubious results (Baneyx and Mujacic, 2004; de Marco 2013; Smith et al., 1990). In this context, we also evaluated structural aspects of the recombinant enzymes and the results are presented below.

Evaluation by circular dichroism (CD) reveals differences of the secondary structure content - The secondary structure of the recombinant enzymes was assessed through circular dichroism spectroscopy (CD). All samples showed an expected α/β protein profile (Figure 3A and 3B). Based on this data, we could estimate their secondary structure composition and compare them to the profile obtained from the commercial EcA enzyme Kidrolase® (α helix = 32.2% and β sheets = 18.3%) (Table 2). Despite the lower temperature having resulted in expression of

soluble proteins in nine tested strains, eight out of nine enzymes showed significant differences of the secondary structures proportion when compared to the commercial enzyme. The Tuner (DE3), C43 (DE3) and Lemo21 (DE3)/pLysS (DE3) strains are used to limit the protein overexpression in three individual ways, respectively: (a) by controlling IPTG entry on the host cells, (b) a mutation that reverts the *lacUV5* back to *lac* and (c) an inhibition of T7 RNA polymerase by T7 lysozyme. However, our results indicate that only the decrease of protein expression is not efficient for rEcA correct folding on cytosol. We also attempted to promote a more pro-oxidant environment in the cytosol, since EcA possess a disulfide bond between the Cys⁹⁹ and Cys¹²⁷, using Origami B (DE3) (a strain which disulfide reductase, TrxA is disrupted) and Shuffle (DE3) (able to produce cytosolic to express the disulfide isomerase, DsbC, in the cytosol). However, the Origami (DE3) strain failure to express rEcA the protein produced in Shuffle (DE3) presented a content of secondary structural elements very distinct from the commercial enzyme (α helix = 18.3% and β sheets = 34.3 %) (Figure 3, Table 2). These data suggest that pro-oxidant cytosol environment is not crucial to obtain rEcA.

The ArcticExpress (DE3) was the only strain able to produce rEcA with secondary structure content very similar to the commercial enzyme. As mentioned before, this strain was constructed to address the solubility issues associated with recombinant overexpression, due to the co-expression of genes encoding for the psychrophilic chaperonins Cpn10 and Cpn60 from *O. antarctica*. This indicates that the supply of auxiliary enzymes like chaperones could be an efficient way to favoring the correct folding of rEcA. On the other hand, the chaperones expressed by GroEL (DE3) couldn't exert an effect similar to the one seen on ArcticExpress (DE3), possibly due to the low activity of GroEL/ES at low temperatures (Ferrer et al. 2003).

Quaternary structure assessment through size exclusion chromatography

(SEC) - The quaternary structure analysis was performed by SEC (Figure 4). The data generated from the recombinant enzymes was compared to the data from Kidrolase® (Figure 4A). The analysis of the commercial enzyme revealed a predominant sharp peak, probably relative to the tetrameric specie, accompanied by a secondary peak (> 150kDa). This suggests the presence of protein aggregates, as previously highlighted by Pieters and colleagues (2008). The same pattern was observed by the recombinant enzymes expressed using the strains SHuffle (DE3) (Figure 4H) and pLysS (DE3) (Figure 4J). On the other hand, only the chromatographic profiles of the ArcticExpress (DE3) strain indicated formation of a unique sharp peak of rEcA (Figure 4B), while the remaining strains presented elution profiles, indicating more compact species and even suggesting dimeric forms of the enzyme (Figures 4C-4J).

The tetramer assembly in EcA mainly depends on the correct apolar interactions from dimer surfaces; enzyme stability increases by hiding these hydrophobic amino acids from the solvent (Sanches et al. 2003). Thus, the alteration of secondary structures could significantly modify the physical and chemical characteristics of those surfaces. This compromises the hydrophobic interactions and leads to the impairment of tetramerization, which ultimately affects enzymatic activity. Therefore, SEC results are in agreement with the results of the secondary structure obtained by CD.

The specific activity differs in the rEcA expressed in different strains - The specific activity of the commercial enzyme Kidrolase® was determined (237.8 ± 9.3 U/mg) (Figure 5) in order to establish a control for the rEcAs. The tetrameric enzymes produced by ArcticExpress (DE3) showed high activity (157 ± 5.3 U/mg). This was expected since the structural analysis indicated high similarity with Kidrolase®. The enzymes produced by pLysS (DE3), Crystal (DE3) and Tuner (DE3) presented intermediate activity (89.0 ± 4.4 , 57.0 ± 1.7 and 41.6 ± 2.0 U/mg, respectively). In the remaining strains, the L-asparaginase activity was negligible (from 2.2 ± 2.1 to 22.4 ± 1.6) (Figure 5) which is in agreement with structural analysis. In fact, the structure of EcA doesn't enable its function as a monomer, because the active site is only fully structured after dimer assembly (Swain et al. 1993; Michalska and Jaskolski 2006). In theory, the dimers have all the necessary attributes for catalysis; nevertheless, the enzyme is found exclusively as a tetramer in physiological conditions and no dimeric rEcA has been demonstrated to possess high enzymatic activity (Swain et al. 1993). The low stability caused by the exposition of hydrophobic amino acids on dimer surfaces could be one of the reasons explaining out results (Sanches et al. 2003).

Discussion - The EcA is an essential biopharmaceutical used on therapeutic protocols for the treatment of the Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), the most common haematological neoplasm in infants (Avramis 2012; Lopes et al. 2017). Recently, a recombinant EcA (rEcA) began to be produced and commercialized by Medac (Spetrila), since the extraction of the native enzyme is considered outdated and present low yields when compared with recombinant expression of proteins (Pieters et al. 2008). Nonetheless, the native or recombinant EcA present a secondary L-glutaminase activity and are prone to form protein aggregates aspects that are related with important side effects of this biodrug (Offman *et al.*, 2011; Kafkewitz and Bendich 1983; Lopes et al. 2017). To overcome these problems engineered EcA recombinant enzymes new sources of asparaginases isolated from other organism are commonly expressed as cytosolic recombinant enzyme (Kotzia et al. 2007; Cappelletti et al. 2008; Oza et al. 2011; Huang et al. 2014; Schalk and Lavie 2014; Han et al. 2014; Meena et al. 2016; Costa et al. 2016; Saeed et al. 2018; Radha et al. 2018; Sindhu and Manonmani 2018). Despite that several bacterial expression systems are available, studies aiming the most appropriated strain to recombinant EcA (rEcA) production or novel or engineered EcA enzymes are absent in the literature.

In the current study, we evaluated different *E. coli* expression strains with different characteristics to enhance the protein expression. Our data indicates that ArcticExpress (DE3) was the best choice for cytosolic production of rEcA, in the conditions tested. ArcticExpress (DE3) strain is specialized in expressing proteins at low temperatures, as it co-expresses psychrophilic chaperonins which assist correct folding. In fact, the analysis of secondary and quaternary structure revealed that the rEcA obtained from ArcticExpress (DE3) presents structural features very similar to

the native enzyme. Additionally, our data also revealed that, in general, the purified recombinant enzymes did not contain protein aggregates when compared to the native commercial preparation. This is a very important feature, since protein aggregates are more immunogenic and less active than tetramers (Rosenberg 2006; Pieters et al. 2008). The other strains analysed produced either poorly folded or low active enzymes, which is far from expected when novel or engineered proteins are been characterized or when the interest is to produce biopharmaceuticals. Therefore, the data presented is valuable not only to enhance the production of rEcA but also may assist in analytical characterization of engineered enzymes, as well novel ASNases coming from biological diversity.

Acknowledgments

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant number 2013/08617-7). Fellowships were granted to WAF (FAPESP, 2016/19245-1), LS (FAPESP, 2014/22039-9) and CAB (FAPESP, 2011/13500-6).

Compliance with ethical standards

There is no conflict of interest and no benefit of any kind will be received either directly or indirectly by the authors.

This article does not contain any studies with human or animals performed by any of the authors.

References

- Amena S, Vishalakshi N, Prabhakar M, Dayanand A, Lingappa K (2010) Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Brazilian J Microbiol* 41:173–178. doi: 10.1590/S1517-83822010000100025
- Arjun JK, Aneesh BP, Kavitha T, Harikrishnan K (2018) Characterization of a novel asparaginase from soil metagenomic libraries generated from forest soil. *Biotechnol Lett* 40:343–348. doi: 10.1007/s10529-017-2470-7
- Armstrong JK, Hempel G, Koling S, Chan LS, Fisher T, Meiselman HJ, Garratty G (2007) Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* 110:103–111. doi: 10.1002/cncr.22739
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J a, Struhl K, Wiley CJ, Allison RD, Bittner M, Blackshaw S (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Avramis VI (2012) Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. *Anticancer Res* 32:2423–2437
- Banerji J (2015) Asparaginase treatment side-effects may be due to genes with homopolymeric Asn codons (Review-Hypothesis). *Int J Mol Med* 36: 607–626. doi: 10.3892/ijmm.2015.2285
- Baneyx F, Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 11:1399-1408.
- Cappelletti D, Chiarelli LR, Pasquetto MV, Stivala S, Valentini G, Scotti C (2008)

Helicobacter pylori L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. Biochem Biophys Res Commun 377:1222–1226. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.118

Costa IM, Schultz L, de Araujo Bianchi Pedra B, Leite MSM, Farsky SHP, de Oliveira MA, Pessoa A, Monteiro G (2016) Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. Sci Rep 6:36239. doi: 10.1038/srep36239

Ferrer M, Chernikova TN, Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN (2003) Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. Nat Biotechnol 21:1266–1267. doi: 10.1038/nbt1103-1266

Galindo RJ, Yoon J, Devoe C, Myers AK (2016) PEG-asparaginase induced severe hypertriglyceridemia. Arch Endocrinol Metab 60:173–177. doi: 10.1590/2359-39970000000068

Ghasemi A, Asad S, Kabiri M, Dabirmanesh B (2017) Cloning and characterization of *Halomonas elongata* L-asparaginase, a promising chemotherapeutic agent. Appl Microbiol Biotechnol 101:7227–7238. doi: 10.1007/s00253-017-8456-5

Graham ML (2003) Pegaspargase: a review of clinical studies. Adv Drug Deliv Rev 55:1293–1302

Han S, Jung J, Park W (2014) Biochemical characterization of L-asparaginase in NaCl-tolerant *Staphylococcus* sp. OJ82 isolated from fermented seafood. J Microbiol Biotechnol 24:1096–1104. doi: 10.4014/jmb.1405.05021

Huang L, Liu YY, Sun Y, Yan Q, Jiang Z (2014) Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and

- Its application in food safety and leukemia treatment. *Appl Environ Microbiol* 80:1561–1569. doi: 10.1128/AEM.03523-13
- Hunger SP, Mullighan CG (2015) Acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med* 373:1541–1552. doi: 10.1056/NEJMra1400972
- Jarrar M, Gaynon PS, Periclou AP, Fu C, Harris RE, Stram D, Altman A, Bostrom B, Breneman J, Steele D, Trigg M, Zipf T, Avramis VI (2006) Asparagine depletion after pegylated *E. coli* asparaginase treatment and induction outcome in children with acute lymphoblastic leukemia in first bone marrow relapse: a Children's Oncology Group study (CCG-1941). *Pediatr Blood Cancer* 47:141–146. doi: 10.1002/pbc.20713
- Kafkewitz D, Bendich A (1983) Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function. *Am J Clin Nutr* 37:1025–1030
- Kansagra A, Dahiya S, Litzow M (2018) Continuing challenges and current issues in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 59:526-541. doi: 10.1080/10428194.2017.1335397.
- Keating MJ, Holmes R, Lerner S, Ho DH (1993) L-asparaginase and PEG asparaginase - past, present, and future. *Leuk Lymphoma* 10:S153–S157. doi: 10.3109/10428199309149129
- Kotzia GA, Labrou NE (2007) L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. *J Biotechnol* 127:657–669. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.07.037
- Kotzia GA, Lappa K, Labrou NE (2007) Tailoring structure–function properties of L-asparaginase: engineering resistance to trypsin cleavage. *Biochem J* 404:337–

343. doi: 10.1042/BJ20061708

Lopes AM, Oliveira-Nascimento L de, Ribeiro A, Tairum CA, Breyer CA, Oliveira MA de, Monteiro G, Souza-Motta CM de, Magalhães P de O, Avendaño JGF, Cavaco-Paulo AM, Mazzola PG, Rangel-Yagui C de O, Sette LD, Converti A, Pessoa A (2017) Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Crit Rev Biotechnol* 37:82–99. doi: 10.3109/07388551.2015.1120705

de Marco A (2013) Recombinant polypeptide production in *E. coli*: towards a rational approach to improve the yields of functional proteins. *Microb Cell Fact.*;12:101. doi: 10.1186/1475-2859-12-101.

Mahajan R V., Kumar V, Rajendran V, Saran S, Ghosh PC, Saxena RK (2014) Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from *Bacillus licheniformis*: *In vitro* evaluation of anti-cancerous properties. *PLoS One* 9:e99037. doi: 10.1371/journal.pone.0099037

Meena B, Anburajan L, Vinithkumar NV, Shridhar D, Raghavan RV, Dharani G, Kirubakaran R (2016) Molecular expression of L -asparaginase gene from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08 in *Escherichia coli*: A prospective recombinant enzyme for leukaemia chemotherapy. *Gene* 590:220–226. doi: 10.1016/j.gene.2016.05.003

Mehta RK, Verma S, Pati R, Sengupta M, Khatua B, Jena RK, Sethy S, Kar SK, Mandal C, Roehm KH, Sonawane A (2014) Mutations in subunit interface and B-cell epitopes improve antileukemic activities of *Escherichia coli* asparaginase-II. *J Biol Chem* 289:3555–3570. doi: 10.1074/jbc.M113.486530

Michalska K, Jaskolski M (2006) Structural aspects of L-asparaginases, their friends

and relations. Acta Biochim Pol 53:627–640.

Narta UK, Kanwar SS, Azmi W (2007) Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. Crit Rev Oncol Hematol 61:208–221. doi: 10.1016/j.critrevonc.2006.07.009

Nguyen HA, Su Y, Zhang JY, Antanasijevic A, Caffrey M, Schalk AM, Liu L, Rondelli D, Oh A, Mahmud DL, Bosland MC, Kajdacsy-Balla A, Peirs S, Lammens T, Mondelaers V, De Moerloose B, Goossens S, Schlicht MJ, Kabirov KK, Lyubimov A V, Merrill BJ, Saunthararajah Y, Van Vlierberghe P, Lavie A (2018) 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 78:1549-1560. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2106

Offman MN, Krol M, Patel N, Krishnan S, Liu J, Saha V, Bates PA (2011) Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. Blood 117:1614–1621. doi: 10.1182/blood-2010-07-298422

Oza VP, Parmar PP, Patel DH, Subramanian RB (2011) Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from *Withania somnifera* L. for large scale production. 3 Biotech 1:21–26. doi: 10.1007/s13205-011-0003-y

Palm GJ, Lubkowski J, Derst C, Schleper S, Röhm KH, Wlodawer A (1996) A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase: Crystal structure of a Thr-89-Val mutant. FEBS Lett 390:211–216. doi: 10.1016/0014-5793(96)00660-6

Patel N, Krishnan S, Offman MN, Krol M, Moss CX, Leighton C, van Delft FW, Holland M, Liu J, Alexander S, Dempsey C, Ariffin H, Essink M, Eden TOB,

- Watts C, Bates PA, Saha V (2009) A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. *J Clin Invest* 119:1964–73. doi: 10.1172/JCI37977
- Pieters R, Appel I, Kuehnel H-J, Tetzlaff-Fohr I, Pichlmeier U, van der Vaart I, Visser E, Stigter R (2008) 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* 112:4832–4838. doi: 10.1182/blood-2008-04-149443
- Pourhossein M, Korbekandi H (2014) Cloning, expression, purification and characterization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in *Escherichia coli*. *Adv Biomed Res* 3:82. doi: 10.4103/2277-9175.127995
- Radha R, Arumugam N, Gummadi SN (2018) Glutaminase free L-asparaginase from *Vibrio cholerae*: Heterologous expression, purification and biochemical characterization. *Int J Biol Macromol* 111:129–138. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.165
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5:172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172
- Rosenberg AS (2006) Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J* 8:E501–E507. doi: 10.1208/aapsj080359
- Roth G, Nunes JES, Rosado LA, Bizarro C V., Volpato G, Nunes CP, Renard G, Basso LA, Santos DS, Chies JM (2013) Recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Brazilian J*

- Saeed H, Ali H, Soudan H, Embaby A, El-Sharkawy A, Farag A, Hussein A, Ataya F (2018) Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* L-asparaginase in *Escherichia coli*. Int J Biol Macromol 106:1041–1051. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.110
- San-Miguel T, Pérez-Bermúdez P, Gavidia I (2013) Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. Springerplus 2:89. doi: 10.1186/2193-1801-2-89
- Sanches M, Barbosa JARG, de Oliveira RT, Abrahão Neto J, Polikarpov I (2003) Structural comparison of *Escherichia coli* L-asparaginase in two monoclinic space groups. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 59:416–422
- Schalk AM, Lavie A (2014) Structural and kinetic characterization of guinea pig L-asparaginase type III. Biochemistry 53:2318–2328. doi: 10.1021/bi401692v
- Schein CH, Noteborn MHM (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. Nat Biotechnol 6:291–294. doi: 10.1038/nbt0388-291
- Sindhu R, Manonmani HK (2018) Expression and characterization of recombinant L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens*. Protein Expr Purif 143:83–91 . doi: 10.1016/j.pep.2017.09.009
- Story MD, Voehringer DW, Stephens LC, Meyn RE (1993) L-asparaginase kills lymphoma cells by apoptosis. Cancer Chemother Pharmacol 32:129–133
- Swain AL, Jaskólski M, Housset D, Rao JK, Wlodawer A (1993) Crystal structure of

Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 90:1474–1478

Tairum CA, Santos MC, Breyer CA, Geyer RR, Nieves CJ, Portillo-Ledesma S, Ferrer-Sueta G, Toledo JC, Toyama MH, Augusto O, Netto LES, de Oliveira MA (2016) Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. Sci Rep 6:33133. doi: 10.1038/srep33133

Upadhyay AK, Singh A, Mukherjee KJ, Panda AK (2014) Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. Front Microbiol 5:486. doi: 10.3389/fmicb.2014.00486

van der Sluis I, Möricke A, Escherich G, von Stackelberg A, Holter W, Klingebiel T, Flotho C, Legien S, Tissing W, Bierings M, Guimbal-Schmolck C, Pichlmeier U, Kühnel H-J, Pieters R (2013) Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Efficacy and safety of recombinant *E. coli* asparaginase in infants (less than one year of age) with acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 98:1697–1701. doi: 10.3324/haematol.2013.090563

Völler S, Pichlmeier U, Zens A, Hempel G (2018) Pharmacokinetics of recombinant asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. Cancer Chemother Pharmacol 81:305–314. doi: 10.1007/s00280-017-3492-5

Wolthers BO, Frandsen TL, Baruchel A, Attarbaschi A, Barzilai S, Colombini A, Escherich G, Grell K, Inaba H, Kovacs G, Liang D-C, Mateos M, Mondelaers V, Möricke A, Ociepa T, Samarasinghe S, Silverman LB, van der Sluis IM, Stanulla M, Vrooman LM, Yano M, Zapotocka E, Schmiegelow K, Ponte di Legno Toxicity Working Group (2017) Asparaginase-associated pancreatitis in childhood acute

lymphoblastic leukaemia: an observational Ponte di Legno Toxicity Working Group study. *Lancet Oncol* 18:1238–1248. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30424-2

Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Maekawa T, Fujimoto J, Yamamoto T, Ishii S (1995) Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J Biol Chem* 270:25328–31

TABLES

Table 1. *Escherichia coli* expression strains used in this study.

Strain	Characteristics	Advantages	Strain selection marks	Source
ArcticExpress (DE3)	Expression of genes <i>cpn10</i> and <i>cpn60</i>	Enhanced folding properties in the cytosol	Gentamycin	Agilent
Tuner (DE3)	Carries the mutation <i>lacY-</i>	Uniform IPTG entry on host cells	-	Novagen
BL21 (DE3)	<i>ompT</i> and <i>lon</i> deficient	Preserves the integrity of recombinant enzymes	-	Novagen
C43 (DE3)	Mutation on LacUV5 promoter	Diminishes expression; ideal for toxic proteins	-	Lucigen
Lemo21 (DE3)	Inducible expression of T7 lysozymes	Inhibits T7 polymerase activity, slowing expression	Chloramphenicol	New England Biolabs
GroEL (DE3)	Overexpresses <i>E. coli</i> chaperones GroEL/ES	Enhanced folding properties in the cytosol	Chloramphenicol	Yasukawa et al. 1995
Shuffle T7	Expresses DsbC and carries mutations on <i>trxB</i> and <i>gor</i>	Favors the formation of disulfide bonds in the cytosol	-	New England Biolabs
T7 Express Crystal	Favors selenomethionine labeling	Ideal for x-ray crystallography	-	New England Biolabs
pLysS (DE3)	Constitutive expression of T7 lysozymes	Inhibits T7 polymerase activity, slowing expression	Chloramphenicol	EMD Millipore
Rosetta (DE3)	Expression of tRNA for rare codons on <i>E. coli</i>	Suitable for mammal protein expression	Chloramphenicol	Novagen
Origami B (DE3)	Carries mutations on <i>trxB</i> and <i>gor</i>	Favors the formation of disulfide bonds in the cytosol	Kanamycin/ Tetracycline	EMD Millipore

Table 2. Estimated secondary structure composition of the rEcA enzymes by CD spectra. Comparative secondary structure composition from recombinant ASNases expressed in different *Escherichia coli* expression strains with the commercial enzyme.

Strain	α -Helix	B-Strand	β -Turn	Random coil
Kidrolase®	32.2%	18.3%	17.2%	32.2%
ArcticExpress	31.9%	19.3%	17.4%	31.4%
Tuner	24.7%	25.5%	17.3%	32.5%
BL21	22.1%	27.8%	17.0%	33.1%
C43	20.8%	29.1%	16.7%	33.2%
Lemo21	21.4%	28.4%	16.9%	33.2%
GroEL	21.6%	28.1%	16.9%	33.2%
SHuffle	18.2%	34.3%	16.8%	30.8%
Crystal	23,6%	26,4%	17,1%	32,9%
pLysS	25,4%	24,4%	17,2%	33,0%

Figure and legends

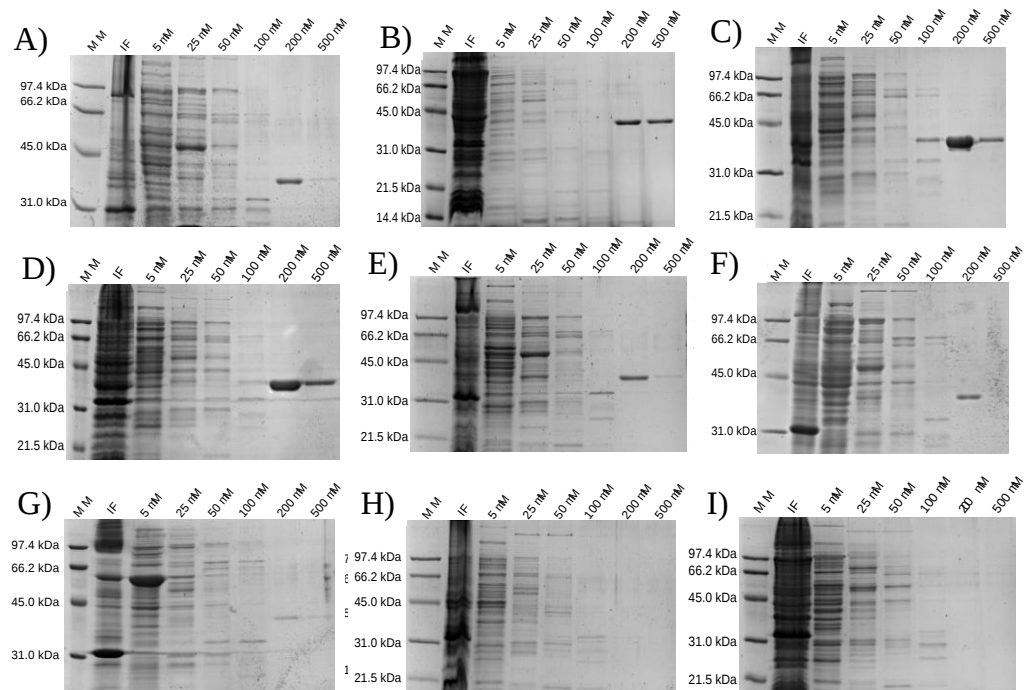


Figure 1. Results of SDS PAGE from purification by IMAC by imidazole gradient of the rEcA expressed in different *E. coli* strains. A) ArcticExpress (DE3), B) Tuner (DE3), C) BL21 (DE3), D) C43 (DE3), E) Lemo21 (DE3), F) GroEL (DE3), G) Shuffle T7, H) Crystal and I) e pLysS (DE3). MM = molecular marker and IF = Insoluble Fraction.

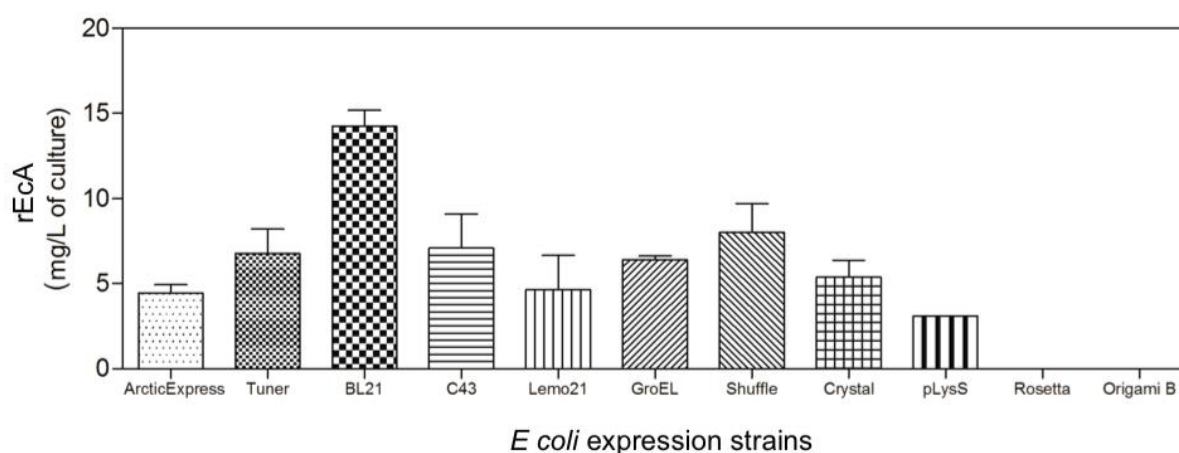


Figure 2. Amounts of purified rEcA obtained by distinct expression strains of *E. coli*. The rEcA of each strain was purified by imidazole gradient from 1 liter of cell culture ($OD_{600} = 0.6-0.8$). The amounts obtained were: ArcticExpress (DE3), 4.44 mg $\pm$ 0.99 mg; Tuner (DE3), 6.76 $\pm$ 0.25 mg; BL21 (DE3), 14.25 mg $\pm$ 1.32 mg; C43 (DE3), 7.08 mg $\pm$ 2.43 mg; Lemo21 (DE3), 4.63 $\pm$ 2.41 mg; GroEL (DE3), 6.39 mg $\pm$ 0.39; Shuffle T7, 8.02 $\pm$ 2.9 mg; T7 Express Crystal, 5.36 mg $\pm$ 1.75 mg; e pLysS (DE3), 3.00 $\pm$ 0.14 mg.

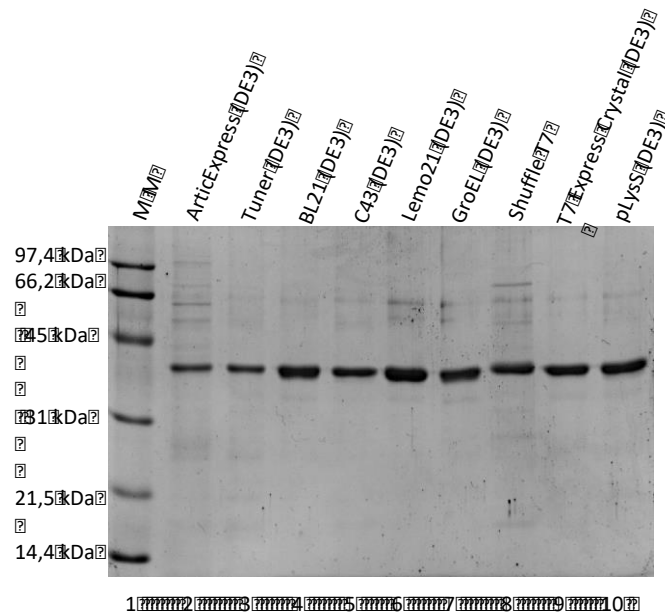


Figure 3. Recombinant proteins after concentration. The rEcA of each strain was purified by imidazole gradient from 1 liter of cell culture ($OD_{600} = 0.6-0.8$). The amounts obtained were: ArcticExpress (DE3), $4.44 \text{ mg} \pm 0.99 \text{ mg}$; Tuner (DE3), $6.76 \pm 0.25 \text{ mg}$; BL21 (DE3), $14.25 \text{ mg} \pm 1.32 \text{ mg}$;

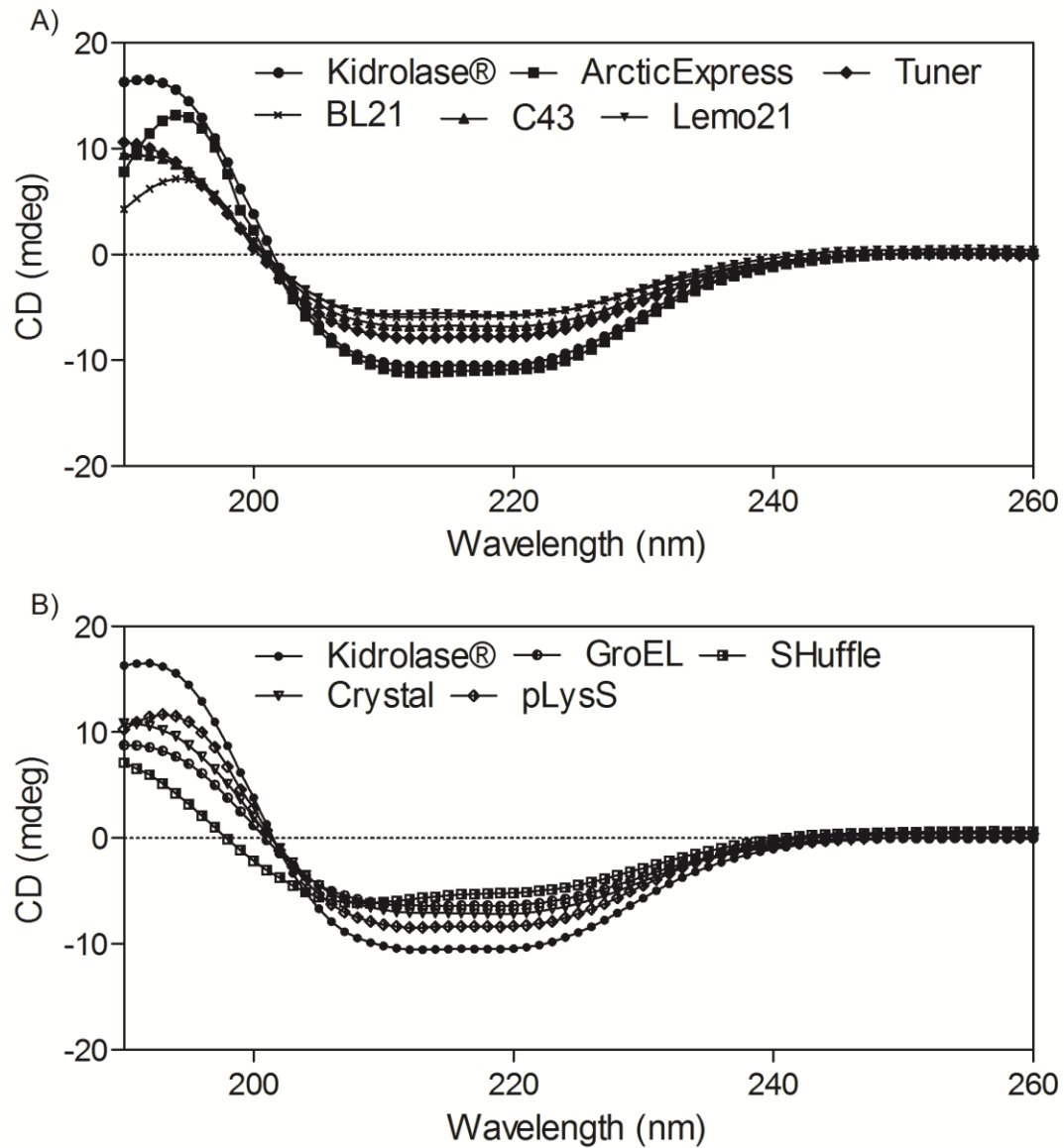


Figure 3. Circular dichroism spectroscopy profile and rEcA compared with the commercial enzyme (Kidrolase®). Spectra of the circular dichroism of commercial EcA Kidrolase® and from the recombinant enzymes produced by different strains. **A)** ArcticExpress (DE3), Tuner (DE3), BL21 (DE3), C43 (DE3), Lemo21 (DE3) and **B)** GroEL (DE3), SHuffle (DE3), Crystal (DE3) and pLysS (DE3). In both figures the commercial enzyme Kidrolase® was used as internal control. In all experiments the buffer used was Tris-HCl 10 mM (pH: 7.4) at 25 °C, while the enzyme concentration was 3 μ M.

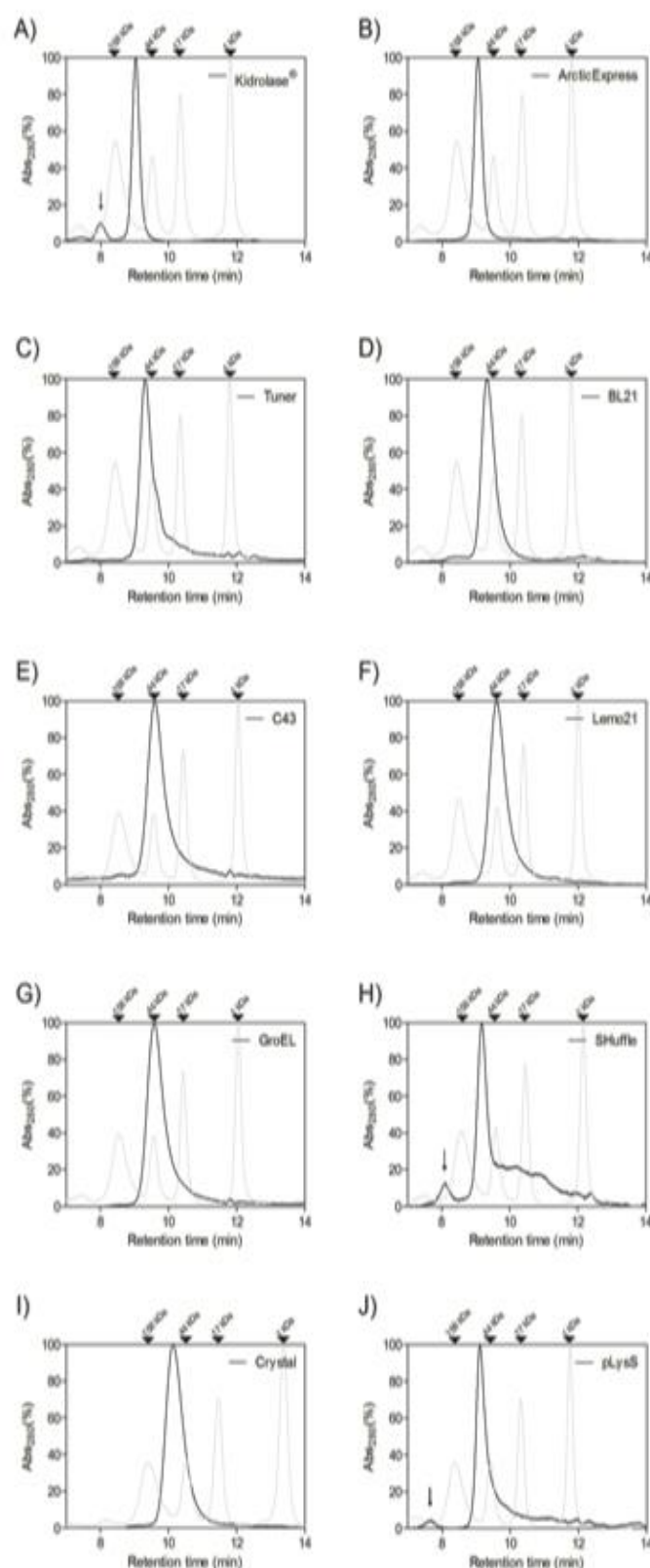


Figure 4. Results from quaternary structure analysis by size exclusion chromatography. For all rECAs, samples were applied at a concentration of 1 mg/mL in the HPLC JASCO using BioSEP SEC-S3000 columns (7.8 × 300 mm, 5 cm, separation range of 5 to 700 kDa) (Phenomenex); the mobile phase was constituted of Tris-HCl (pH= 7.4) and flow of 1 mL × s⁻¹. Bovine γ globulin (158 kDa),

chicken ovalbumin (44 kDa), and horse myoglobin (17 kDa) (BioRad) were used as molecular weight standards. **(A)** Kidrolase[®], **(B)** ArcticExpress (DE3), **(C)** Tuner (DE3), **(D)** BL21 (DE3), **(E)** C43 (DE3), **(F)** Lemo21 (DE3), **(G)** GroEL (DE3), **(H)** SHuffle (DE3), **(I)** Crystal (DE3) and **(J)** pLysS (DE3). The arrows indicate protein aggregate peaks.

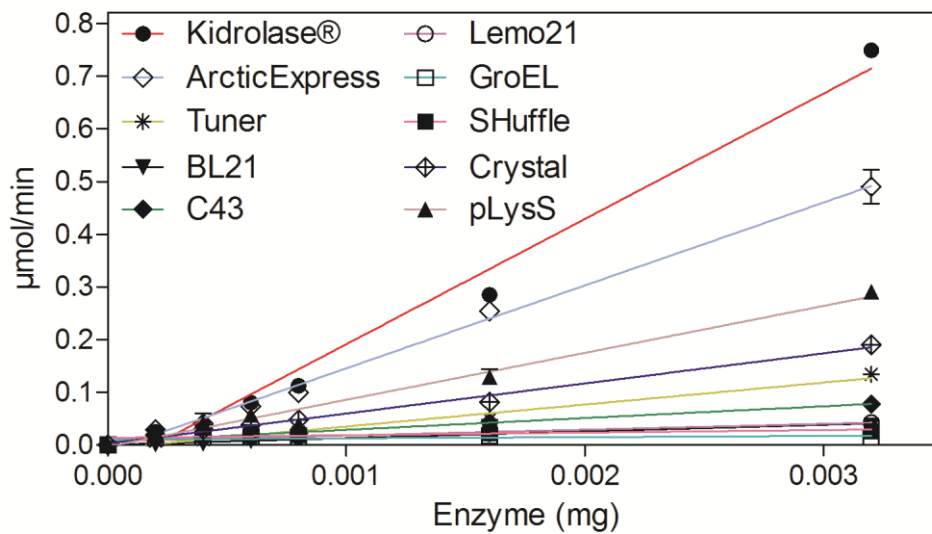


Figure 5. Result from specific activity determination through Nessler method. Representative graphic from the specific activity assay using the rEcA obtained from different strains. The reaction was carried for 20 minutes at 37°C and stopped by adding TCA (final concentration of 0.3 M). The product from this first reaction was then mixed with Nessler's reagent and analyzed on a spectrophotometer at 440 nm to assess the amount of NH_3 produced. The results were: Kidrolase®, 237.8 ± 9.3 ; ArcticExpress (DE3), 157.3 ± 5.3 ; Tuner (DE3), 41.6 ± 2.0 ; BL21 (DE3), 12.5 ± 1.2 ; C43 (DE3), 22.4 ± 1.6 ; Lemo21 (DE3), 10.9 ± 1.2 ; GroEL (DE3), 2.2 ± 2.1 ; SHuffle (DE3), 4.9 ± 1.9 ; Crystal (DE3), 57.0 ± 1.7 ; and pLysS (DE3), 89.0 ± 4.4 .

Apêndice F

Zampieri, B. D. B.; Pinto, A. B.; Schultz, L.; de Oliveira, M. A.; Oliveira, A. J. F. C. Diversity and Distribution of Heavy Metal-Resistant Bacteria in Polluted Sediments of the Araça Bay, São Sebastião (SP), and the Relationship Between Heavy Metals and Organic Matter Concentrations. *Microbial Ecology*, 72 (3) 582–594, 2016.

Diversity and Distribution of Heavy Metal-Resistant Bacteria in Polluted Sediments of the Araçá Bay, São Sebastião (SP), and the Relationship Between Heavy Metals and Organic Matter Concentrations

Bruna Del Busso Zampieri¹ · Aline Bartelochi Pinto¹ · Leonardo Schultz³ · Marcos Antonio de Oliveira³ · Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira²

Received: 17 May 2016 / Accepted: 13 July 2016 / Published online: 1 August 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Heavy metals influence the population size, diversity, and metabolic activity of bacteria. In turn, bacteria can develop heavy metal resistance mechanisms, and this can be used in bioremediation of contaminated areas. The purpose of the present study was to understand how heavy metals concentration influence on diversity and distribution of heavy metal-resistant bacteria in Araçá Bay, São Sebastião, on the São Paulo coast of Brazil. The hypothesis is that activities that contribute for heavy metal disposal and the increase of metals concentrations in environment can influence in density, diversity, and distribution of heavy metal-resistant bacteria. Only 12 % of the isolated bacteria were sensitive to all of the metals tested. We observed that the highest percentage of resistant strains were in areas closest to the São Sebastião channel, where port activity occurs and have bigger heavy metals concentrations. Bacteria isolated were most resistant to Cr, followed by Zn, Cd, and Cu. Few strains resisted to Cd levels greater than 200 mg L⁻¹. In respect to Cr, 36 % of the strains were able to grow in the presence of as much as 3200 mg L⁻¹. Few strains were able to grow at concentrations of Zn and Cu as high as 1600 mg L⁻¹, and none grew at the highest concentration of 3200 mg L⁻¹. *Bacillus* sp. was most frequently

isolated and may be the dominant genus in heavy metal-polluted areas. *Staphylococcus* sp., *Planococcus maritimus*, and *Vibrio aginolyticus* were also isolated, suggesting their potential in bioremediation of contaminated sites.

Keywords *Bacillus* sp. · Bacterial resistance · Contamination · Heavy metals · Port areas

Introduction

A major concern nowadays is the impact of heavy metal-release into natural environments by man [1]. This kind of pollution has ecological consequences and presents a serious risk to human health because heavy metals are ubiquitous and very persistent pollutants [2].

The marine environment is often a dump site for contaminated wastewater produced by many industries. It is also the location of oil exploration and active harbors, and it is crossed by transport routes of large ships. All of these activities can generate heavy metal contamination [3]. Losses, leaks, and spills occur during loading and unloading of transport vessels, during materials storage, during chemical transfers, upon washing of isocontainers, and during maintenance of wash bays, and during commercial leaching [4].

Thus, the interest over the impacts of heavy metals on the marine environment is a growing area of scientific research. In the sea, these contaminants largely accumulate in the sediment, and their deposition generates toxicity to aquatic biota including microorganisms, which are present in the sediment [5, 6].

Heavy metals play an important role in processes involving microorganisms in sediments. Metals such as calcium, zinc, nickel, iron, potassium, magnesium, manganese, and cobalt

✉ Bruna Del Busso Zampieri
brunadbzampieri@gmail.com

¹ Biochemistry and Microbiology Department, Biology Institute, São Paulo State University—Rio Claro Campus (UNESP Rio Claro), São Paulo, Brazil

² Marine Microbiology Laboratory (MICROMAR), Biosciences Institute, São Paulo State University—UNESP, Coastal Campus, São Paulo, Brazil

³ Molecular Structural Biology Laboratory, Biosciences Institute, São Paulo State University—UNESP, Coastal Campus, São Paulo, Brazil

are essential nutrients at low concentrations. These elements participate in biochemical catalysis, acting as protein and nucleic acid stabilizers, and enzyme cofactors, and participating of several biological processes in the cell as osmotic balance, oxidative phosphorylation, motility, and regulation of membrane channels activity [7, 8].

High metal concentrations are toxic to microorganisms due to their abilities to affect conformational changes on the structure of nucleic acids and proteins, and also could interfere in several biological processes [7]. Abiotic stress caused by metals can affect the growth, morphology, and metabolism of bacteria [9, 10]. Consequently, heavy metals can change the size, composition, and activity of the microbial community [11], altering, as well, the bacterial densities and diversity [6], which is worrisome, once marine microorganisms are of critical importance to the health of the environment, and the life on the planet. They are integral to all major biogeochemical cycles, fluxes, and processes that occur in marine systems where elements move between oxidized and reduced forms. Microorganisms are extremely abundant and diverse, and they play a key role in the regulation of the earth's climate [12]. Marine microorganisms also provide essential goods and services to human societies through their production of oxygen, their support of a sustainable food supply, and their part in regulating the health of the marine environment [13]. Bacteria are also the first step in the transfer of toxic compounds to higher trophic levels of the food chain [14].

Bacteria have developed several defense mechanisms to combat stress caused by heavy metals. These mechanisms include metal-complex formation, reduction of certain metals to less toxic species, or efflux of the metals from the cell [15, 16].

Because these microorganisms are able to transform these toxic compounds into less toxic or non-toxic, they are potentially useful in bioremediation of contaminated soils and sediments [17]. Such application is especially useful with marine bacteria, which live in the extreme environments conditions and can be utilized *in situ* [18].

Studies to detect, isolate, and monitor the occurrence of bacteria that are resistant to heavy metals in the marine environment are relatively recent and scarce, particularly in Brazil, but studies on marine areas in several countries have shown the importance of the presence of these bacteria in marine environments [12, 19, 20].

Some studies show that heavy metal discharge into the environment not only causes selection of heavy metal-resistant bacteria but may also cause selection of antibiotic-resistant bacteria. This occurs because some mechanisms for heavy metal resistance function in a similar way of those for resistance to antibiotics. Thus, an environmental problem involving heavy metal contamination may become a public health issue [12].

These results reflect the importance of studies on heavy metal-resistant bacteria in coastal and estuarine areas, particularly in areas that receive domestic and industrial sewage and waste from harbor activities. Several regions of Brazilian coast are chronically contaminated by untreated sewage discharge that brings to coastal waters various substances, including heavy metals. An example of a contaminated region is the area in which the Port of São Sebastião is located [4]. Additionally, in these areas, the problem is compounded by the presence of tourist routes, high population densities. At the same time, there is the presence of rich and important biodiversity. For these reasons, studies on heavy metal-resistant bacteria in polluted areas are very important.

Therefore, this study aimed to isolate and identify heavy metal-resistant bacteria in Araça Bay and São Sebastião Channel sediments to test the hypothesis that activities that contribute for heavy metal disposal and the increase of metals concentrations in environment, like harbors and sewage discharge, can influence in density, diversity, and distribution of heavy metal-resistant bacteria.

Material and Methods

Study Area

Araça Bay is located in the city of São Sebastião, in north coast of São Paulo State, southeastern Brazil, in an area adjacent to the Port of São Sebastião. This port is of significant economic importance to the country. Its natural setting places it as the third best port in the world [21].

Araça Bay includes ecosystems such as rocky shores, sandy beaches, and mangroves. It is part of a sublittoral zone that extends into the São Sebastião Channel. It also has widespread biological diversity [22].

Because of the proximity of urban human developments, this set of different ecosystems is exposed to different types of human activity, including illegal occupation and waste dumping. The bay adjoins the Port of São Sebastião and the Petrobras Waterway Terminal, where there are frequent oil spills and other complications. In addition, there is a proposal to expand the harbor on Araça Bay, threatening all its biodiversity [22].

One of the largest oil terminals in Brazil is located in the center of this region. At the Araça Bay, a marine outfall is located, by which almost all domestic sewage from the city of São Sebastião is discharged [23].

Sample Collection and Analysis

Sediment samples were collected quarterly using a corer (10 cm of length) at 37 sites along the Araça Bay during 1 year. The Araça Bay was divided in two sample regions: the

intertidal zone and the sublittoral zone (Fig. 1). The intertidal zone is dominated by a tidal regime and is exposed during low tide. The sublittoral zone is not exposed during low tide, has a greater depth, and is more dominated by currents [24].

For each collection station, the sample of 10 g of sediment was added to 90 mL of saline solution, homogenized, and serially diluted to 10^{-5} . From the serial dilutions, 1 mL of the 10^{-3} and the 10^{-5} dilutions was inoculated into Marine Agar 2216 (MA, Difco) and plated using the pour plate method. All plates were prepared in triplicate. Inoculated plates were incubated at 28 °C for 48 h. The colonies were counted and the densities were expressed as colony-forming units per gram of sediment (CFU g⁻¹).

One hundred colonies were randomly selected and subcultured three successive times under the same culture conditions. Resistance testing was then applied to these isolated and purified colonies. Each colony isolated was tested for heavy metal resistance by determining the minimum inhibitory concentrations (MIC). The MICs of four different heavy metals (Cd, Cr, Cu, and Zn) were determined for each isolate using Mueller–Hinton agar (Difco), which contained each metal in concentrations ranging from 12.5 to 3200 µg mL⁻¹. The four heavy metals were tested in the following form: CdSO₄·8/3H₂O; ZnSO₄·7H₂O; CuSO₄·5H₂O; K₂CrO₄ (Merck). The isolates were considered resistant if the MICs exceeded that of the control organism. *Escherichia coli* K-12 ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 strains were used as controls organisms [25, 26]. The isolates that were found to be resistant to the heavy metals were then molecularly identified.

After identification, an average of the minimum inhibitory concentration of each species was made.

Identification by Microbiological and Molecular Biology Approaches

After initial characterization by colony morphology, each isolate was then identified on the basis of 16S rRNA gene sequencing. For this purpose, each isolate was grown in Nutrient Broth prepared with sterile and filtered seawater. Its genomic DNA subsequently extracted using the PureLink® Genomic DNA Kit (Thermo Fisher Scientific). The DNA was extracted following the recommendation of the manufacturer. The DNA integrity was checked by agarose gel electrophoresis (0.8 % in TAE 1×, containing 10 µM of ethidium bromide) and the samples were quantified spectrophotometrically. Gene amplification was carried out using previously published oligonucleotides sequences: 27S-F (5'-CAAGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3') and 1492-R (5'-GGTTACCTTGTTAC GACTT-3'). The polymerase chains reactions consisted in: 1× PCR buffer (Invitrogen, Milan, Italy), 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM of each dNTP, 15 pmol of each oligonucleotide, 100 ng of genomic DNA, and 1 U of Taq polymerase in a

final volume of 50 µL. Initial denaturation at 94 °C for 5 min was followed by 30 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 2 min. A final extension at 72 °C for 10 min was used. The amplification of was checked by agarose gel electrophoresis, as described before, and PCR products were purified using the PureLink® Quick Gel Extraction and PCR purification Combo Kit (Thermo Fisher Scientific)

DNA Sequencing and Data Analysis

Purified PCR product (50 ng) was used to cycle sequence the DNA using the ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific), following the conditions suggested by the manufacturer and using 5 pmol of the oligonucleotides 27S-F or 1492-R. Then the samples were injected in the ABI 310 automated sequencer (Thermo Fisher Scientific). The chromatograms were evaluated using the Chromas software (www.technelysium.com.au) and analyzed using BioEdit software [27]. The 16S rRNA gene sequences (~1360 nucleotides) were assembled from multiple readouts (using the forward and reverse primers) and compared to nucleotide sequences of the NCBI GenBank using the Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) to the organisms' identification. The multiple sequence alignments were performed using Clustal Omega [28] Columns and the gaps were removed. The final tree was obtained using MEGA 6 [29]. The sequences were assigned to species using the highest-scoring sequence for which species information was available when the sequence similarity was greater than 97 %.

Evaluation of the Heavy Metal Concentrations and Organic Matter Content

To determine the organic matter content of the sediment samples, 100 g of each sample was dried at 105 °C and then heated to 250 °C for 5 h. Next, the dried sample was weighed, and the difference between the initial and final weight was determined. The weight difference was used as a measure of the organic matter content of the sediment.

Four heavy metal for analyses, chromium (Cr), copper (Cu), cadmium (Cd), and zinc (Zn), were chosen. These metals were chosen because they present significant concentrations in Brazilian coastal waters near harbors and industrial areas [30]. To analyze the concentration of these metals, sediment samples were frozen and lyophilized according to the SW 846 method 3051 from the EPA [31]. Metals were quantified using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). Certified reference materials (CRMs) EnviroMAT SS-1 and EnviroMAT SS-2 (SCP Science) were used as stoichiometry standards in elemental analysis.

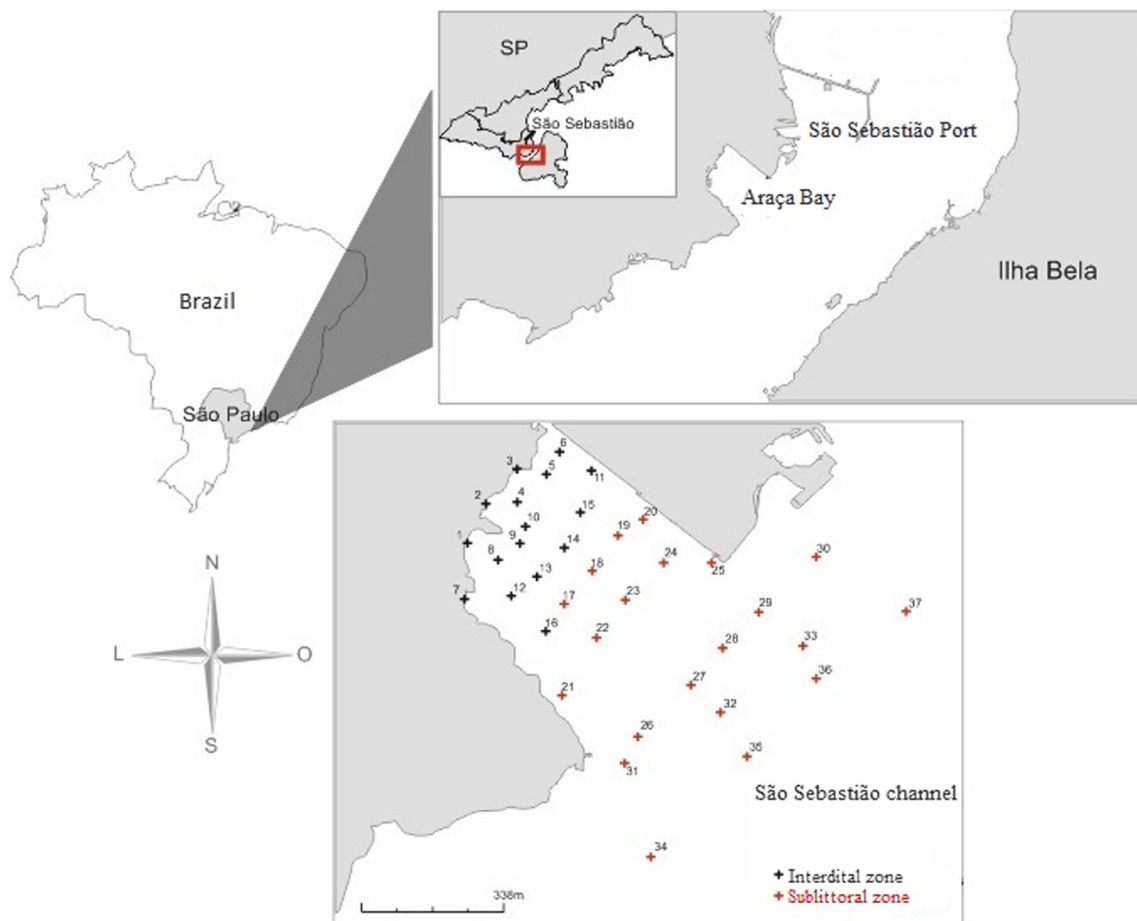


Fig. 1 Map of São Sebastião region showing the location of the São Sebastião Channel and the Araça Bay in detail with the sampling sites located in the sublittoral zone [1–16] and in the intertidal zone [17–37]

Statistical Analyses

Statistical analyses were conducted using “R” version 2.5.0. All the environmental and biological parameters were analyzed in order to evaluate normality through a Shapiro–Wilk test (SW) and equality of variances through a Levene test (L). Data with not normal distribution and heteroscedasticity was compare using Mann–Whitney non-parametric test for independent samples and correlation was made using Spearman correlation. To analyze frequency of heavy metal resistance strains, the Chi square test was used. Finally, a multivariate analysis was made using Principal Components Analysis (PCA) (Past3).

Results

Bacterial Abundance, Percentage of Organic Matter, and Metal Concentration in Sublittoral and Intertidal Zones

The bacterial concentration varied among the stations, especially among those from the sublittoral zone.

Maximum values reached $85 \cdot 10^4$ CFU g⁻¹. The lowest values were between 7 and 10^4 CFU g⁻¹. Cell concentrations were significantly higher in the sublittoral zone ($p = 0.000025$) (Fig. 2).

The percentage of organic matter in the sediment ranged from 4.9 to 14.8 %. The highest peaks were recorded at points within the sublittoral zone, which had an average percentage of 13.7 %. Meanwhile, the average among the points within the intertidal zone was 6.5 % ($p = 0.002$). The metal with the highest concentration in the sediment was Zn: its average concentration was 38.84 mg kg^{-1} . It was followed by Cr at 19.8 mg kg^{-1} , Cu at 5.47 mg kg^{-1} , and Cd at 0.25 mg kg^{-1} (Fig. 3). All metal concentrations tested were significantly higher in the sublittoral zone (Cd: $p = 0.0088$; Cr: $p = 0.002$; Cu: $p = 0.037$; and Zn: $p = 0.049$).

Since Brazil has no legislation concerning the heavy metal concentrations in sediment that are able to produce harmful effects on the biota and in the surrounding ecosystem in this study, we used the reference values of Canadian Sediment Quality Guidelines (SQG) for marine sediments [32] (Table 1).

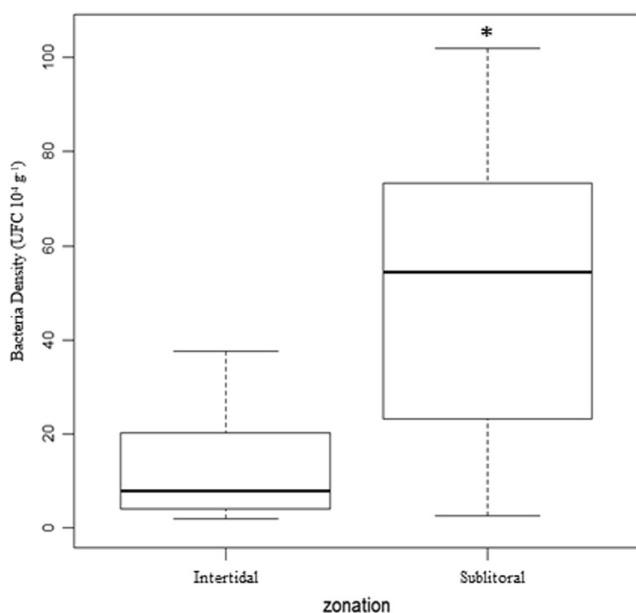


Fig. 2 Average bacterial density in the sublittoral zones and intertidal zones. Where *black line* = mean; *box* = mean $\pm$ standard error; *whiskers* = mean $\pm$ 5 % confidence interval; and *symbol (asterisk)* = represents statistical difference ($p < 0.05$)

Evaluation of the Resistance from Isolated Bacterial Strains to Heavy Metals

Out of 100 isolated strains (50 from intertidal zone and 50 from sublittoral zone), 53 % were resistant to chromium, 52 % to zinc, 38 % to cadmium, and 10 % to copper (Fig. 4). The bacteria were more resistant to the metals that were present at higher concentrations (Cr and Zn) in the study region. However, despite the low concentration of Cd in the sediment, a significant percentage of resistant strains were found.

The tolerance of the isolated bacterial strains for each heavy metal tested is shown in Table 2. Few strains tolerated Cd concentration levels greater than $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. In the case of Cr, 36 % of the strains even grew at a concentration of $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$. In respect to Zn and Cu, few strains (4 and 2 %, respectively) tolerated $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$, and none were able to tolerate the highest concentration ($3200 \mu\text{g mL}^{-1}$).

A multi-resistance profile of each strain was also evaluated. Our results revealed that only 23 % of the strains were susceptible to any heavy metal tested, 49 % were resistant to more than two heavy metals simultaneously, and 7 % of the bacteria were resistant to all four metals (Cd, Cu, Cr, and Zn). A higher percentage of metal-resistant bacteria were found in the sublittoral zone (note that this is also the zone in which the highest concentrations of metals were found). Only the correlation with cadmium was reverse. In the intertidal zone, both a lower concentration of metals and a smaller percentage of resistant strains were observed (Fig. 4).

In the sublittoral zone, bacteria were more resistant to Zn, Cu, and Cr, whereas in the intertidal zone, the strains were more resistant to Cd and Cr (Fig. 4). Note that all higher heavy metal concentrations occur in the sublittoral zone when resistance to Zn and Cu was considered (Zn: $p = 0.0077$, $X^2 = 7.1$, $df = 1$; Cu: $p = 0.0003$, $X^2 = 13.31$; $df = 1$).

Spatial Distribution of the Heavy Metals and Resistant Strains

We also investigated the correlation between the metal-resistant bacteria and the heavy metal concentration within the sampling areas. Figure 5 shows the maps of metal concentration distribution in the sampled areas within the São Sebastião Channel and the Araçá Bay. The sampling sites in the sublittoral zone are numbered 1–16, and those in the intertidal zone are numbered 17–37. Notice that all higher heavy metal concentrations were in the sublittoral zone, which is most influenced by the harbor.

This pattern is very similar to that of Zn- and Cr-resistant bacteria, which are present in higher numbers in the areas where the concentrations of these metals are more abundant. In the case of Cd-resistant bacteria, this relationship is reversed (Fig. 6).

Multivariate Analysis

Now it is possible to see in Fig. 7 how all variables influence in each other. To confirm which factor influenced the most in explaining the data, a PCA was performed. It was possible to notice that heavy metals concentration had a clear influence in heavy metal-resistant bacteria in sediment. Only for Cd that this relationship was inverse. The components 1 and 2 demonstrated higher strength explaining together 76 % of the variance (56.8 and 19.5, respectively).

Evaluation of the Bacterial Strains Abundance by 16S rRNA Subunit Gene Analysis

The genetic molecular analysis from the gene of 16S rRNA subunit allowed revealed the prevalence of *Bacillus* sp. out of the 50 strains isolated in this study. Quantitatively, only four species account to ~75 % of the bacterial identified in this work. *Bacillus pumilus* occurred most frequently in the samples (38 %), followed by the *Bacillus cereus* (18 %), *Vibrio alginolyticus* (10 %), and *Planococcus maritimus* (8 %). The abundance of other bacteria varied from 2 % (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus safensis*, and *Bacillus boroniphilus*) to 3 % (*Bacillus aerophilus*, *Enterobacter asburiae*, *Exiguobacterium* sp, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *Staphylococcus* sp, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*) (Fig. 8).

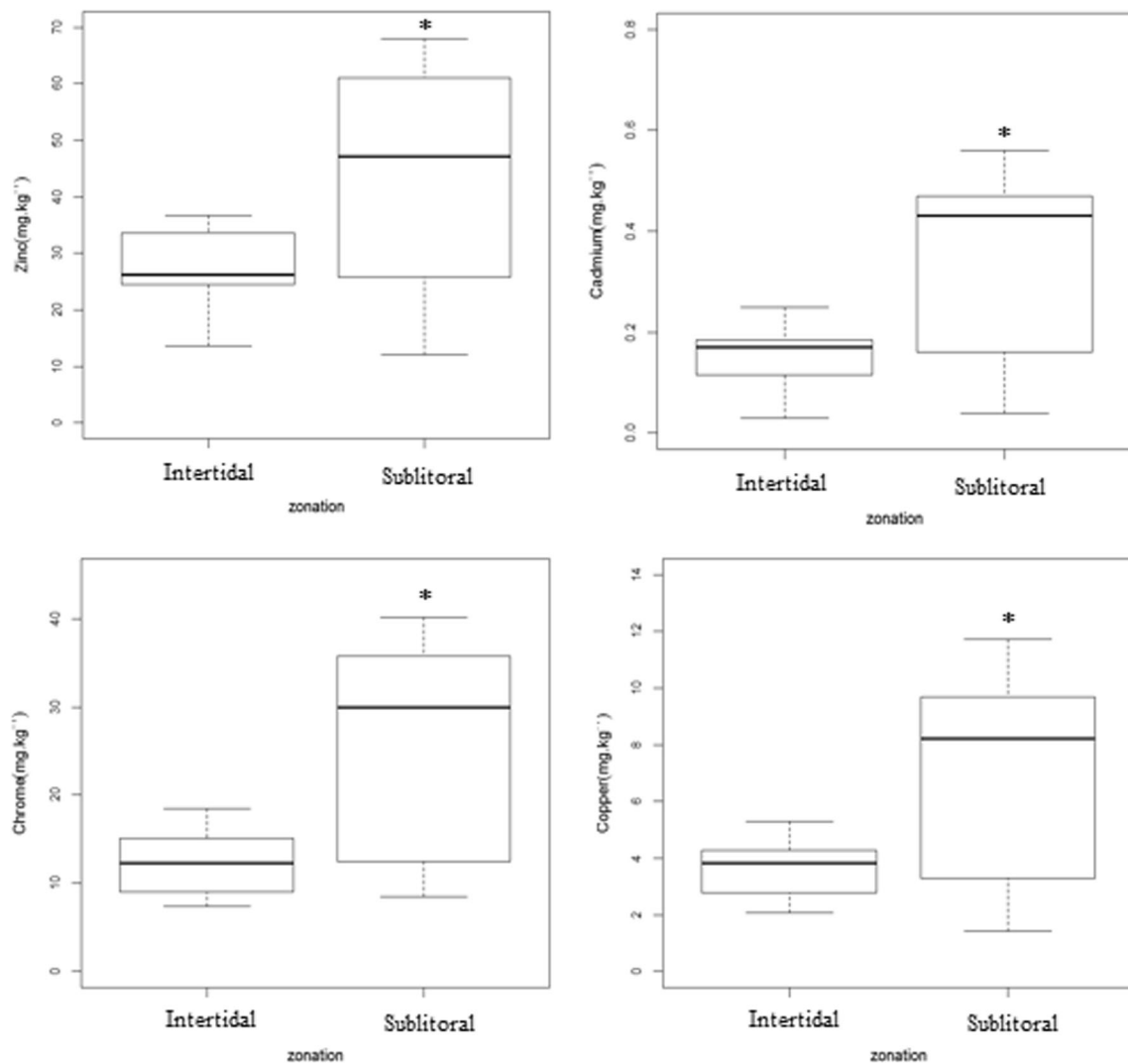


Fig. 3 Heavy metal concentrations (mg kg^{-1}): zinc (a), cadmium (b), copper (c), and chromium (d) from two sampling zones (intertidal and sublittoral). Where black line = mean; box = mean $\pm$ standard error;

whiskers = mean $\pm$ 5 % confidence interval; and symbol (asterisk) = represents statistical difference ($p < 0.05$)

Minimum Inhibitory Concentration Analysis

Each genus responded differently to the heavy metals tested in this study when MIC was considered. In the case of zinc,

Table 1 References values for heavy metal concentrations in estuarine sediments as per the Canadian Sediment Quality Guidelines (SQG)

Metal	TEL (mg kg^{-1})	PEL (mg kg^{-1})
Zn	124.0	271.0
Cr	52.3	160.0
Cu	18.7	108.0
Cd	0.7	42

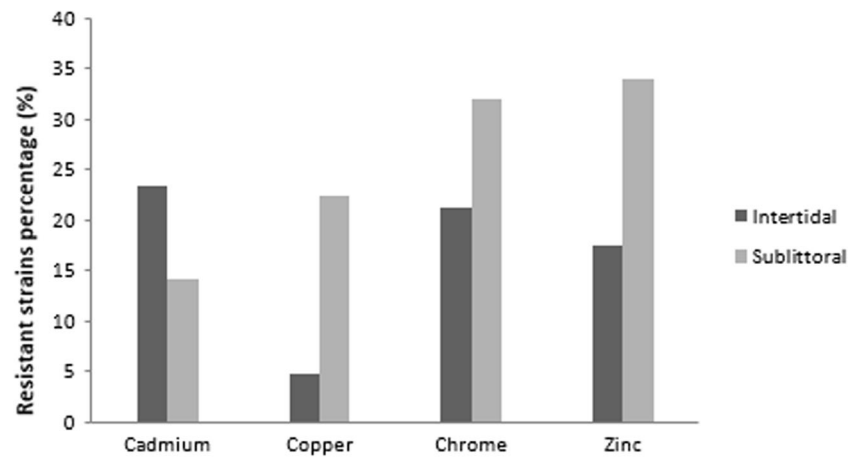
TEL threshold effect level, PEL probable effect level

Enterobacter sp. and *Exiguobacterium* sp. exhibited the highest average MIC ($1600 \mu\text{g mL}^{-1}$). The lowest MIC ($12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) was exhibited by *Micrococcus* sp. (Fig. 9a).

All genera presented high MICs of chromium. *Exiguobacterium* sp. reached $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$, followed by *Bacillus* sp., *Vibrio* sp., and *Staphylococcus* sp., whose MICs were similar and ranged from 2400 to $2614 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 9b). *Enterobacter* sp. had the highest MIC of copper ($1600 \mu\text{g mL}^{-1}$). The other genera exhibited values ranging from 250 to $568 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 9c).

Cadmium was the metal with the lowest MIC among the strains. The highest peak was obtained by *Micrococcus* sp. ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$), while the lowest peak was obtained by *Exiguobacterium* sp. ($12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Concentrations among the other genera ranged from 200 to $249 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 9d).

Fig. 4 Percentage of strains found to be resistant to the heavy metals tested (cadmium, copper, chromium, and zinc) in the intertidal zone and the sublittoral zone. The symbol (asterisk) represents statistical differences



Discussion

The sediment has been considered to be a layer of the water column in which pollutants accumulate because of its high adsorption and storage capacities. In the sediment, pollutant concentrations are found to be several orders of magnitude higher than those found in water. Sediments are therefore good indicators both of acute and chronic pollution [33].

The heavy metal concentrations determined in most of the samples were below the values established by Canadian law. However, in some parts of the sublittoral zone, the levels obtained were above the limits. These levels are likely because of the nearby refineries, fossil fuel burning, and industrial and domestic effluent discharge, all of which end up influencing Zn, Cr, Cd, and Cu concentrations found in these sediments [34].

In the present study, the highest metal concentrations were observed in the sublittoral zone. The collection stations in the sublittoral zone are near or even within the São Sebastião channel, where pollution originating mostly from the harbor, domestic, and industrial effluents occurs. The local hydrodynamics also allow the high accumulation of metals and organic matter in the sublittoral zone. Castro-Filho [35] and Fontes [36] showed that the circulation of the São Sebastião channel is characterized by northerly and southerly movements, with day-long intervals and little influence from tidal currents. This indicates that part of the pollution coming from the northern

part of the channel, where the harbor and the Almirante Barroso Waterway Terminal (TEBAR) are located, may have an influence on the deposition of heavy metals into the sediments of the Araçá Bay.

Already in 1977, it was found that bacteria in marine environments undergo selection or adjustment when heavy metals are present [37]. It has also been found that heavy metals can change the size, composition, and activity of the microbial community [11]. Abiotic stress caused by metals can affect the growth, morphology, and metabolism of bacteria [9, 10].

In the current study, however, the highest density of bacteria was found in the sublittoral zone, in which the metal concentrations are higher. This fact can be explained by the presence of wastewater discharge close to the sublittoral zone, where there is a high organic matter concentration that favors bacterial growth. Another likely factor is that the highest densities of bacteria occur in areas with higher concentrations of metals because most of the bacteria present there are already resistant as a result of chronic contamination [20].

Generally, metal contaminations in the environment cause an increase in the level of resistance among the local bacterial community [38] and reduce the bacterial diversity as a consequence of bottleneck events [39]. Therefore, the higher the heavy metal concentration, the higher will be the occurrence of heavy metal-resistant bacteria. This finding was confirmed in this study for in the case of Zn and Cr. The higher concentration of these two metals in sediments also presented more

Table 2 Heavy metal tolerance among bacteria isolated from Araçá Bay sediment

Metal	Percentage (%) of tolerant isolated strain at different metal concentrations ($\mu\text{g mL}^{-1}$)										Resistant isolates (%)
	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	3200	>3200	
Cadmium	54.0	51	49	38 ^a	22	7	0	0	0	0	38
Copper	100	95	94.1	86	42	25	10 ^a	2.0	0	0	10
Cadmium	100	100	100	100	100	97.0	65.8	53 ^a	36.0	0	53
Zinc	100	96.0	94.0	93.0	72.0	52 ^a	42	4	0	0	52

^a Minimal inhibition concentrations of standard strain *E. coli* K12

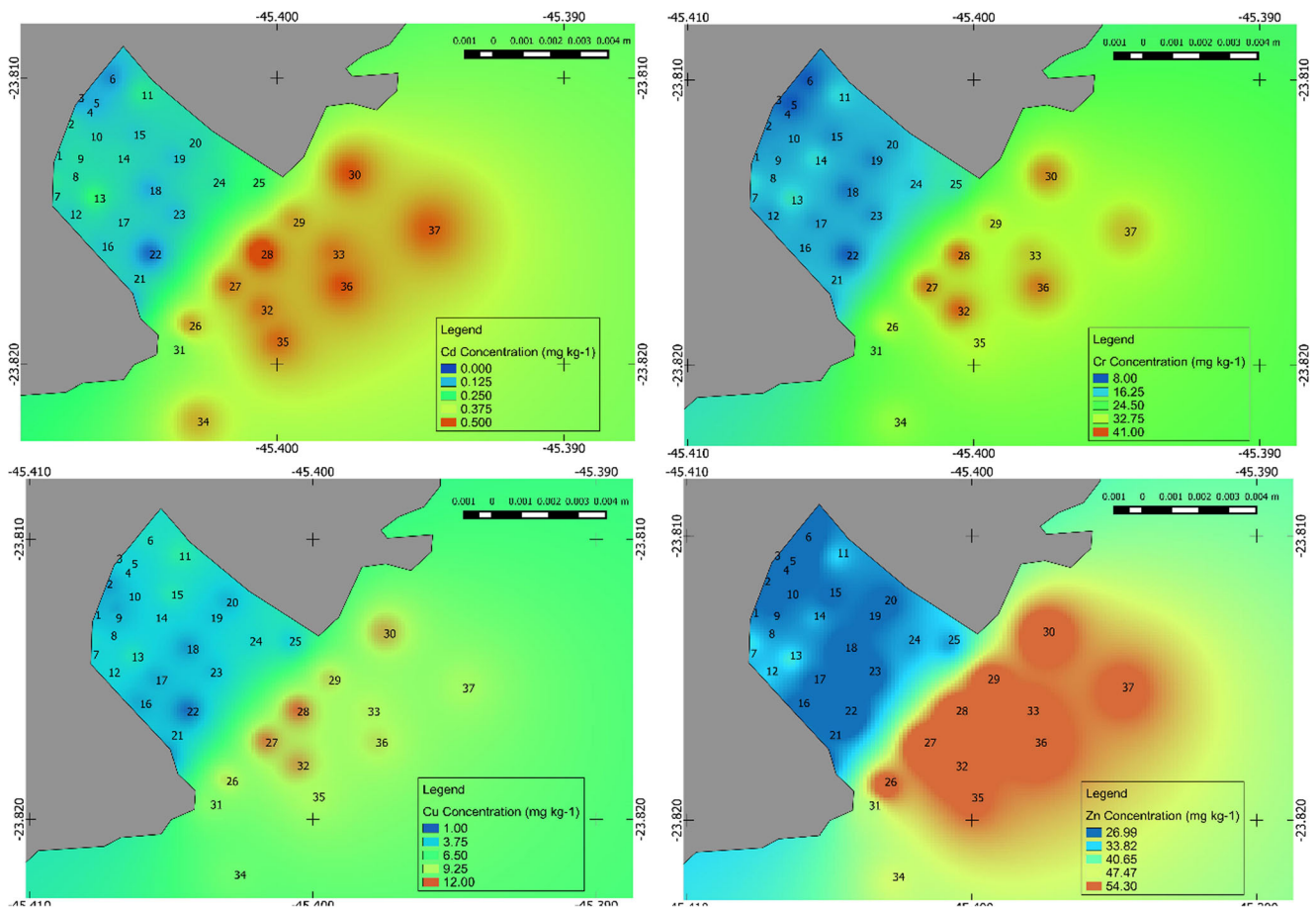


Fig. 5 Distribution of concentrations of Cd (a), Cr (b), Cu (c), and Zn (d) in sampled areas in the São Sebastião Channel and in the Araça Bay, with a sublittoral zone [1–16] and an intertidal zone [17–37]

than half of resistant strains identified in this work. Cu that was found at the lowest concentration presented the lowest percentage of resistant strains to Cu.

In this study, more bacterial strains were resistant to chromium than to the other metals tested. This difference may be explained by the relatively low toxicity of chromium compared to the toxicity of the other metals. Chromium (and particularly Cr(VI)) exhibits little biological activity because of low interaction with macromolecules and may be considered less toxic than other heavy metals [40].

It is well known that zinc is a trace element that is essential for bacterial cell growth, but it is a potent inhibitor of electron transport in cellular respiration when present at high concentrations [41]. However, its toxicity is very low compared to that of other metals such as Hg, Cd, Cu, Ni, Co, and Pb [42]. This factor may explain the results obtained in this study, in which more than half of the strains of bacteria isolated from Araça Bay were resistant to Zn.

The bacteria exhibited low resistance to Cu. This difference may occur because this metal is associated with acute and chronic toxicity in bacteria, and because it strongly affects the enzyme system and essential cellular metabolism [43].

Of the bacterial strains, 38 % were resistant to cadmium, despite the low concentrations of this metal in the sediments of the Araça Bay. In fact, several studies have reported the presence of bacteria that are tolerant of heavy metals, even at sites with very low heavy metal concentrations [44]. This difference can be explained by cadmium's toxicity. Cd is the most toxic metal for living organisms, and low doses have been found to have adverse effects on biota [32]. Low Cd concentrations are able to select resistant bacteria because higher concentrations are lethal [45].

The results of PCA analysis confirms the hypothesis proposed in this study, as well all the points discussed above. Higher bacteria resistance was found in areas with high concentration of heavy metals, except for Cd because of its extreme toxicity. However, although Fig. 2 has shown that intertidal zone, which had a lower heavy metal concentration in general, had a lower bacteria density, PCA showed that highest concentrations of metals reduce bacterial density in the marine environment.

Akinbowale, Peng, Grant, and Barton [25] found the same bacterial resistance to metals tested in this study. The resistance occurred in the following order: Cu > Cr > Zn > Cd.

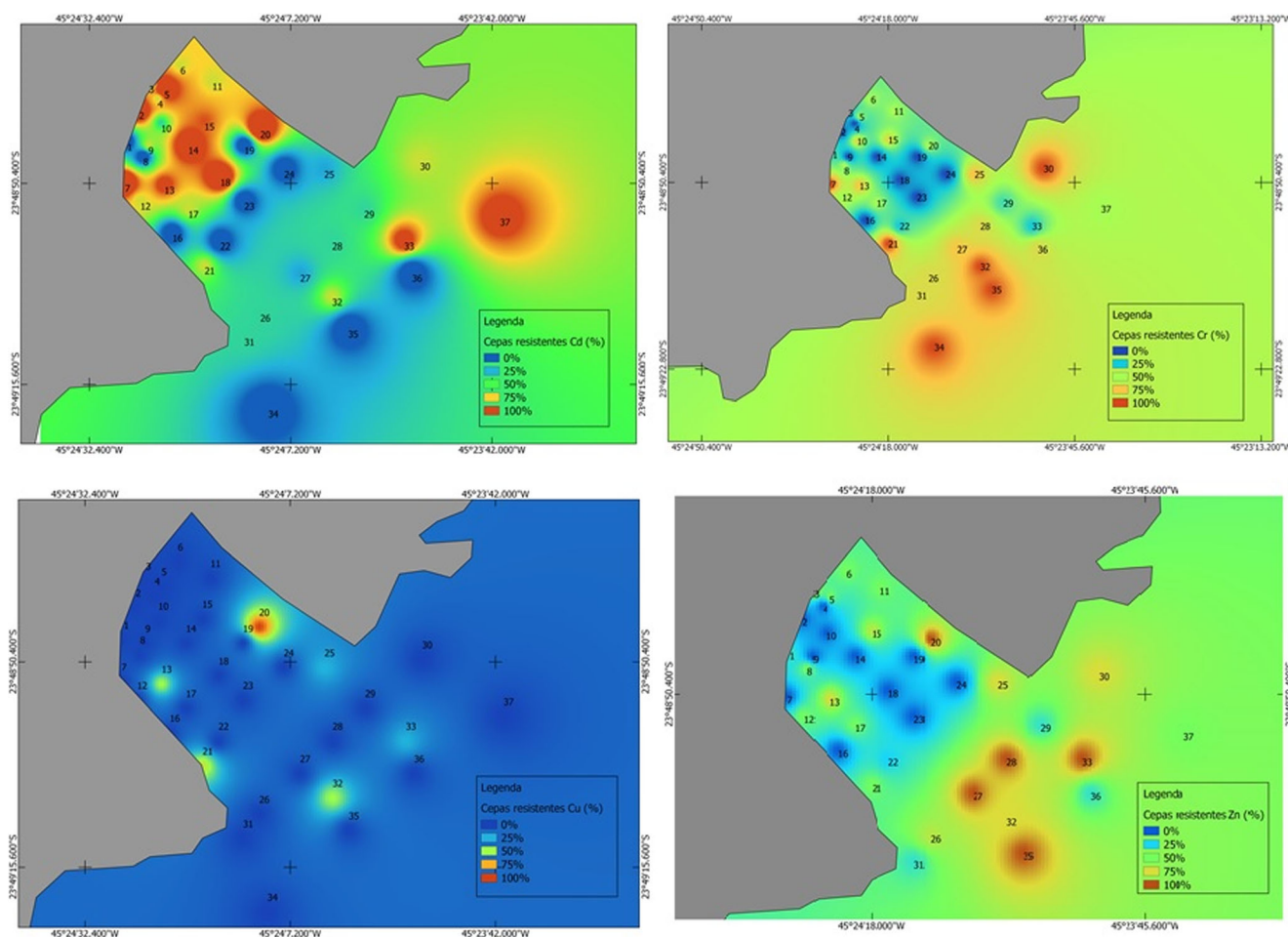


Fig. 6 Distribution of bacteria resistant to Cd (a), Cr (b), Cu (c), and Zn (d) in sampled areas in the São Sebastião Channel and in the Araçá Bay, with the sublittoral zone [1–16] and the intertidal zone [17–37]

Matyar, Kaya, and Dinçer [46] studied the sediments of the Iskenderum Bay in Turkey and found bacteria to be more resistant to Cd, followed by Cu and Cr. This discrepancy suggests that there are differences in the heavy metal concentrations in sediments from different areas depending on the surrounding anthropogenic activities. These differences may be reflected in the bacterial resistance profile of the region.

MICs are important to understand the level of resistance and may be associated with the concentrations and toxicity of metals in the environment. Malik, Khan, and Aleem [38] isolated bacterial strains from the soil of industrial areas and reported highest MIC of $2400 \mu\text{g mL}^{-1}$ for Cu, Cd, Zn, and Cr. In this study, the MIC of almost all of the metals reached maximum values of $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$. The exception was Cd, the MIC of which reached a maximum value of $800 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Malik and Jaiswal [47] also found high MICs in their isolated strains and associated this result with sampling area location. Similar to the current study, Malik and Jaiswal [47] collected their samples from locations close to points of industrial and domestic effluent discharge. In the present study,

the collection points were close to domestic sewage and industrial wastewater discharge points, and were also close of the São Sebastião Port and the TEBAR.

Thus, the distribution of resistant bacteria in the Araçá Bay may be associated with effluent discharge, since both the highest concentrations of metals and the higher percentages of resistant strains were found at the points of the sublittoral zone near the São Sebastião channel. These results also support the existence of higher heavy metal contamination in the São Sebastião channel.

Though the metal concentrations found in this study were below the reference values from Canadian Sediment Quality Guidelines (SQG) overall, a high frequency of resistant bacterial strains was also found. These results suggest that the heavy metals likely have effects on the biota, particularly in the sublittoral area. The findings also suggest that these populations of microorganisms are in the process of undergoing biological and genetic changes.

This fact is very important, since bacteria are the most abundant organisms in the sediment and represent the first

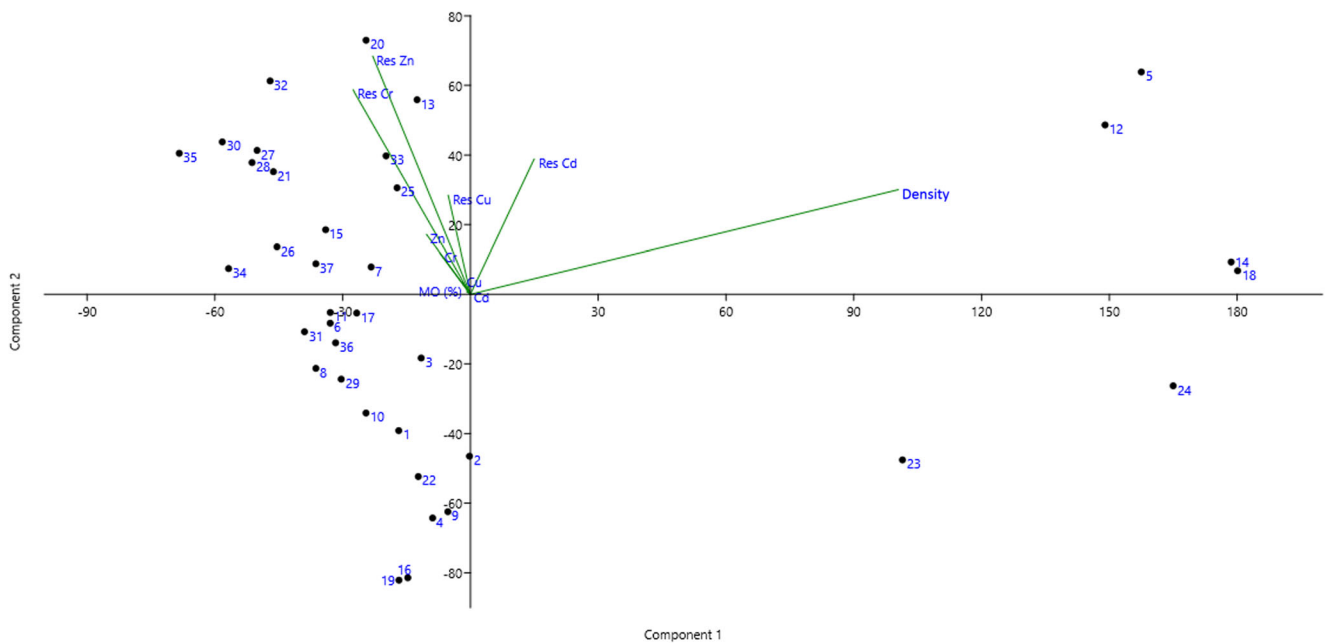


Fig. 7 Principal components analysis (PCA) of stations using variables: density; organic matter; Zn concentration (Zn); Cu concentration (Cu); Cr concentration (Cr); Cd concentration (Cd); percentage of resistant bacteria to Zn (Res Zn), Cu (Res Cu), Cr (Res Cr), and Cd (Res Cd)

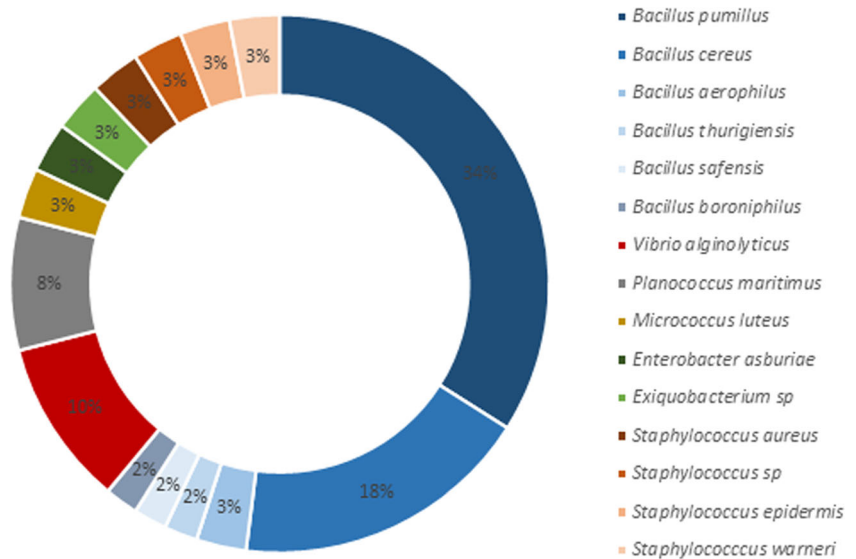
steps of toxic component transfer to higher trophic levels [14]. Because of these factors, the results suggest the need for pollution monitoring in the Araça Bay.

A significant portion of the bacteria identified in this study belongs to the group of Gram-positive bacteria, which is similar to findings from other studies [20, 48, 49]. Previous studies estimated that only 5 % of the bacteria found in the ocean was gram-positive [50], but more recent studies suggest that the abundance and diversity of Gram-positive in the sediments are much larger [49, 51, 52]. The present study suggests a higher abundance and diversity of gram-positive bacteria in Brazilian marine sediments.

The isolates were also identified. The frequency of *Bacillus* genus was substantially higher relative to the other genera. Bacteria resistant to heavy metals were isolated in several other studies with results similar to ours [53–55]. This consistency may indicate that *Bacillus* sp. possesses significant potential for the bioremediation of marine and estuarine areas polluted with heavy metals.

Kamala-Kannan and Lee [56] isolated bacteria resistant to heavy metals in sediments of the Sunshon Bay in South Korea. All isolates were identified as *Bacillus* sp. This finding suggests that anthropogenic pollution ultimately selects for resistant species. In this case, *Bacillus* sp.

Fig. 8 Percentages of bacterial species isolated from sediment samples and identified by the analysis of the 16S rRNA subunit gene



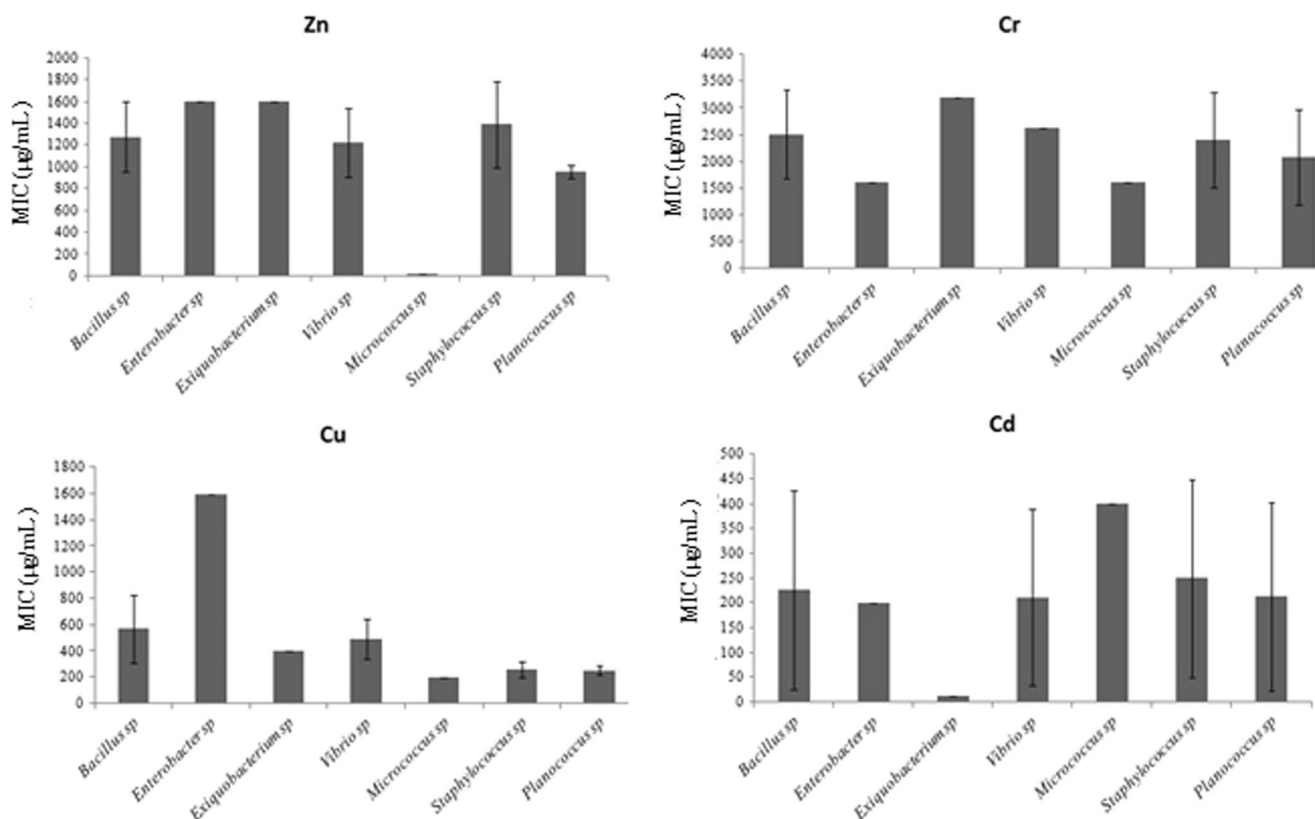


Fig. 9 Average minimum inhibitory concentration (MIC) of zinc (a), chromium (b), copper (c), and cadmium (d) for each bacterial genera isolated

was the dominant taxonomic group in the communities of heterotrophic bacteria in the polluted areas.

Staphylococcus sp. is also a genus that may be used in bioremediation. *Staphylococcus* sp. may be resistant to multiple heavy metals, findings which are similar to those obtained in the present study [57]. Several species of *Vibrio* and *P. maritimus* were also isolated from marine sediments in other studies and exhibited resistance to various metals, as well as simultaneous resistance to antibiotics [20].

Pollution of the marine environment by effluents from factories, harbor activities, and other sources containing heavy metals selects for bacteria that are resistant to various metals. As a result, this pollution is a problem not only for the local biota but also for public health, since simultaneous resistance to metals and antibiotics is a reciprocal phenomenon [57].

Recently, the Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks suggested that various biocides, including heavy metals, may contribute to the selection and maintenance of bacteria with antibiotic resistance [58]. This contribution may occur through the horizontal transfer of genetic elements carrying genes that confer resistance to antibiotics and biocides or that share the same resistance mechanisms [58–60].

This problem is exacerbated by the fact that many of these bacteria are pathogenic and can cause serious problems to humans. For example, *S. aureus* has become very relevant in

recent decades in respect to nosocomial infection with high levels of morbidity and mortality; in most cases, its multidrug resistance makes treatment difficult [61]. Another example is *B. cereus*, which can cause serious food-borne illness [62].

This effect on public health is another factor that reflects the need for heavy metal contamination-monitoring in the environment. This contamination could lead to heavy metal-resistant bacteria that are more likely to be resistant to antibiotics.

The points discussed support the hypothesis of this study. In Araçá Bay there is a clear relationship between heavy metal concentration and selection of heavy metal-resistant bacteria. There are groups that dominated the environment like *Bacillus* sp. Some implications are particularly important: it was possible to isolate bacteria with great biotechnological potential; the monitoring of heavy metal pollution has to be encouraging due the impact in microbial population and to the possibility of pathogenic strains also be resistant to antibiotics.

Conclusion

In this way, this study showed that the presence of harbor activities increase heavy metals concentration that influence the distribution of resistant strains, selecting a larger number of bacteria resistant to various forms of heavy metals. In

addition, it may alter the microbial community and ecosystem function. We isolate several species of heavy metals-resistant bacteria with high MIC that can be used for future studies of marine bioremediation of contaminated areas in Brazil. Moreover, we observed that there is a dominance of *Bacillus* sp. in this area and it can have high resistance to metals tested that could be an indicator of heavy metal-contaminated areas.

Acknowledgments The authors would like to thank UNESP and all members of the Marine Microbiology Laboratory (MICROMAR) and of the Structural Molecular Biology Laboratory (LABIMES). The Brazilian agency known as the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and São Paulo Research Foundation (FAPESP) are acknowledged for financial support: The Biota Araça Research Project (process number: 2011/50317-5), coordinated by Dr. Cecilia Amaral.

References

- Sun W, Zhou Q, Xie X, Liu R (2010) Spatial, sources and risk assessment of heavy metal contamination of urban soils in typical regions of Shenyang, China. *J Hazard Mat* 174:455–462. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.09.074
- Andrade S, Poblet A, Scagliola M, Vodopivec C, Curtosi A, Pucci A, Marcovecchio J (2001) Distribution of heavy metals in surface sediments from an Antarctic marine ecosystem. *Environ Monit Assess* 66:147–158
- Teitzel GM, Parsek MR (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 69:2313–2320
- Hortellani MA, Sarkis JES, Abessa DMS, Sousa ECPM (2008) Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do estuário Santos–São Vicente. *Química Nov* 31:10–19. doi:10.1590/S0100-40422008000100003
- Yang H, Rose NL (2003) Distribution of Hg in six lake sediments core across the UK. *Sci Total Environ* 304:391–404. doi:10.1016/S0048-9697(02)00584-3
- Pinto AB, Pagnocca FC, Pinheiro MA, Fontes RF, Oliveira AJ (2015) Heavy metals and TPH effects on microbial abundance and diversity in two estuarine areas of the Southern-central coast of São Paulo State, Brazil. *Mar Pollut Bull* 96:410–417. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.04.014
- Poole RK, Gadd GM (1989) Metals: microbe interactions. IRL Press, Oxford, pp 1–37
- Ji G, Silver S (1995) Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *J Indust Microbiol* 14:61–75
- Wang Y, Shi J, Wang H, Chen OL, Chen Y (2007) The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotox Environ Safat* 67:75–81. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.03.007
- Oliveira A, Pampulha ME (2006) Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *J Biosci Bioeng* 102:157–161. doi:10.1263/jbb.102.157
- Giller PS, Malmqvist B (1998) The biology of streams and rivers. Oxford University Press, New York
- Matyar F (2012) Antibiotic and heavy metal resistance in bacteria isolated from the Eastern Mediterranean Sea coast. *Bull Environ Contam Toxicol* 89:551–556. doi:10.1007/s00128-012-0726-4
- Glöckner FO, Stal LJ, Sandaa RA, Gasol JM, O’Gara F, Hernandez F, Labrenz M, Stoica E, Varela MM, Bordalo A, Pitta P (2012) Marine microbial diversity and its role in ecosystem functioning and environmental change. In: Calewaert JB, McDonough N (eds) Marine Board Position Paper 17. Marine Board-ESF, Ostend, Belgium
- Gillan DC, Danis B, Pernet P, Joly G, Dubois P (2005) Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* 71:679–690
- Banerjee S, Gonthalwal R, Sahu PK, Sao S (2015) Microbial observation in bioaccumulation of heavy metals from the ash dyke of thermal power plants of Chhattisgarh, India. *Adv Biosc Biotechnol* 6:131–138. doi:10.4236/abb.2015.62013
- Outten FW, Outten CE, O’halloran T (2000) Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance. In: Storz G, Hengge-Aronis RR (eds) Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, D.C, pp 145–157
- Hasin AA, Gurman SJ, Murphy LM, Perry A, Smith TJ, Gardiner PE (2010) Remediation of chromium(VI) by a methane-oxidizing bacterium. *Environ Sci Technol* 44:400–405. doi:10.1021/es901723c
- Dash HR, Magdwani N, Chakraborty J, Kumari S, Das S (2013) Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:561–571. doi:10.1007/s00253-012-4584-0
- Kacar A, Kocyigit A (2013) Characterization of heavy metal and antibiotic resistant bacteria isolated from Aliaga Ship Dismantling Zone, Eastern Aegean Sea, Turkey. *Int J Environ Res* 7:895–902
- Nithia C, Pandian SK (2010) Isolation of heterotrophic bacteria from Palk Bay sediments showing heavy metal tolerance and antibiotic production. *Microbiol Res* 165:578–593. doi:10.1016/j.micres.2009.10.004
- ANTAQ. Porto de São Sebastião. Available in: www.antaq.gov.br/portal/pdf/portos/2012/saosebastiao.pdf; Accessed in: 05/09/2015.
- Amaral ACZ, Migotto AE, Turra A, Svhaeffer-Novelly Y (2010) Araça: biodiversidade, impactos e ameaças. *Biota Neotropica* 10:1–47. doi:10.1590/S1676-06032010000100022
- Gubitoso S (2010) Influência de efluentes domésticos e petroquímicos em sedimentos e carapaças de foraminíferos do canal de São Sebastião, SP. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Feng H, Han X, Zhang W, Yu L (2004) A preliminary study of heavy metal contamination in Yangtze River Interdital zone due to urbanization. *Mar Poll Bull* 49:910–915. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.06.014
- Akinbowale OL, Peng H, Grant P, Barton MD (2007) Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int J Antimicrob Agents* 30:177–182
- Ansari MI, Malik A (2007) Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresour Techno* 98:3149–3153
- Embley TM, Stackebrandt E (1994) The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 48:257–289
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, KarplusK LW, Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7: 539. doi:10.1038/msb.2011.75
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Abessa DMS, Carr RS, Rachid BRF, Sousa ECPM, Hortelani MA, Sarkis JE (2005) Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. *Mar Pollut Bull* 50:875–885

31. USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1994) Method 3051. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. Revision 0. September.
32. CCME (2002) Canadian environmental quality guidelines, National Guidelines and Standards Office. Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg, p 12
33. Föstner UG, Wittmann GTW (1981) Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag, Berlin
34. Abessa DM, Rachid BR, Moser GA, Oliveira AJF (2012) Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: uma revisão. *O Mundo da Saúde* 36:643–661
35. Castro-Filho BM (1990) Wind driven currents in the Channel of São Sebastião: winter, 1979. *Boletim do Instituto Oceanográfico* 38:111–132
36. Fontes RFC (1995) As Correntes no Canal de São Sebastião. Dissertação de Mestrado. IOUSP, 159p
37. Azam F, Vaccaro RF, Gillespie PA, Moussalli EI, Hodson RE (1977) Controlled ecosystem pollution experiment: effect of mercury on enclosed water columns. *Mar bacterioplank Mar Sci Comm* 3:313–329
38. Malik A, Khan IF, Aleem A (2002) Plasmid incidence in bacteria from agricultural and industrial soils. *World J Microbiol Biotechnol* 18:827–833
39. Torsvik V, Sørheim R, Goksøyr J (1996) Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. *J Indust Microbiol* 17:170–178
40. Arslam P, Beltrame M, Tomasi A (1987) Intracellular chromium reduction. *Bioch Biophys Acta* 931:10–15
41. Choudhury R, Srivastava S (2001) Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Current Sci* 81:768–775
42. Duxbury T (1981) Toxicity of heavy metals to soil bacteria. *FEMS Microbiol Letters* 11:217–220
43. Achard-Joris M, Moreau JL, Lucas M, Baudrimont M, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Boudou A, Bordineaud JP (2007) Role of metallothioneins in superoxide radical generation during copper redox cycling: defining the fundamental function of metallothioneins. *Biochimie* 9:1474–1488. doi:10.1016/j.biochi.2007.06.005
44. Duxbury T, Bicknell B (1983) Metal tolerant bacterial population populations from natural and metal polluted soils. *Soil Biol Bioch* 15:243–250
45. Kafizadeh F, Zahirian Y, Zolgharnein H (2013) Isolation and molecular identification of mercury resistant bacteria and detection of *Escherichia coli* mercuric reductase gene from wastewater of Khovr-e-Musa, Iran. *Int J Biosci* 3:313–318. doi:10.12692/ijb/3.8.313-318
46. Matyar F, Kaya A, Dinçer S (2008) Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Sci Total Environ* 407:279–285. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.08.014
47. Malik A, Jaiswal R (2000) Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. *World J Microbiol Biotechnol* 16:177–182
48. Spain A, Alm C (2003) Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Rev Undergrad Res* 2:1–6
49. Gontang EA, Fenical W, Jensen PR (2007) Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 73:3272–3282
50. Zobeel CE (1946) Marine microbiology: a monograph on hydrobacteriology. Chronica Botanica Co, Waltham, M.A
51. Stach JEM, Bull AT (2005) Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 87:3–9
52. Jensen PR, Mincer J, Williams PG, Fenical W (2005) Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Leeuwenhoek* 87:43–48
53. Belliveau BH, Staradub ME, Trevor JT (1991) Occurrence of antibiotic and metal resistance and plasmids in *Bacillus* strains isolated from marine sediment. *Canad J Microbiol* 37:513–520
54. Kamala-Kannan S, Mahadevan S, Krishnamoorthy R (2006) Characterization of a mercury-reducing *Bacillus cereus* isolated from the Pulicat Lake sediments, South East Coast of India. *Archiv Microbiol* 185:202–211
55. Kamala-Kannan S, Krishnamoorthy R, Lee KJ, Purosothaman A, Santhi K, Rao NR (2007) Aerobic chromate reducing *Bacillus cereus* isolated from the heavy metal contaminated ennore creek sediment, North of Chennai, Tamil Nadu, South East. *India Res J Microbiol* 2:133–140
56. Kamala-Kannan S, Lee KJ (2008) Metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* species isolated from Sunchon Bay, South Korea. *Biotechnol* 7:149–152
57. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV (2006) Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance. *Trends Microbiol* 14:176–182. doi:10.3389/fmicb.2012.00399
58. SCENIHR. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (2009) Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf, Accessed in: 27 de setembro de 2014.
59. Hasman H, Aarestrup FM (2002) *tcrB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptides resistance. *Antib Agents Chemot* 46:1410–1416
60. Martínez JL (2011) Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2:265. doi:10.3389/fmicb.2011.00265
61. Velázquez-Meza ME (2005) *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. *Salud Publica Mex* 47:381–387
62. Anderson Borge GI, Skeie M, Sorhaug T, Langsrud T, Granum PE (2001) Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int J Food Microbiol* 69:237–246