



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

PRISCILA LAMB WINK

**PRODUÇÃO DA ENZIMA ANTILEUCÊMICA *L*-ASPARAGINASE II A PARTIR DA CLONAGEM DO GENE *ErA* DE *ERWINIA CAROTOVORA* SUPSP. *ATROSEPTICA* EM *ESCHERICHIA COLI***

Porto Alegre

2009

PRISCILA LAMB WINK

**PRODUÇÃO DA ENZIMA ANTILEUCÊMICA *L*-ASPARAGINASE II A PARTIR DA CLONAGEM DO GENE *ErA* DE *ERWINIA CAROTOVORA* SUPSP. *ATROSEPTICA* EM *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

2009

## **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

W773p Wink, Priscila Lamb

Produção da enzima antileucêmica L-Asparaginase II a partir da clonagem do gene ErA de *Erwinia carotovora* supsp. atroseptica em *Escherichia coli* / Priscila Lamb Wink. – Porto Alegre, 2009.

529 f.

Diss. (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos.

1. Leucemia Linfoblástica Aguda. 2. Proteína terapêutica.

3. L-asparaginase II. 4. Terapia Anticâncer I. Santos, Diógenes

### **Bibliotecário Responsável**

Ginamara Lima Jacques Pinto  
CRB 10/1204

PRISCILA LAMB WINK

**PRODUÇÃO DA ENZIMA ANTILEUCÊMICA *L*-ASPARAGINASE II A PARTIR DA CLONAGEM DO GENE *ErA* DE *ERWINIA CAROTOVORA* SUPSP. *ATROSEPTICA* EM *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em 24 de março de 2009

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Denise Cantarelli Machado – PUCRS

---

Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Junior – PUCRS

---

Prof. Dr. José Artur Bogo Chies – UFRGS

---

Dedico este trabalho ao meu avô,  
Sérgio de Meda Lamb, exemplo de ser humano e de  
profissional, e minha principal fonte de inspiração.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Diógenes Santiago Santos e Prof. Luiz Augusto Basso, agradeço pela oportunidade de ingressar no CPBMF, o que tem me proporcionado muito aprendizado e crescimento acadêmico, pela confiança depositada e pelo apoio intelectual sempre prestado.

Agradeço também a Heique Bogdawa, pela ajuda na elaboração deste trabalho, pelos ensinamentos e pelo apoio.

Quero agradecer, especialmente, a Gaby Renard, José Eduardo Saconni Nunes e Cláudia Paiva Nunes, pela atenção, apoio, ensinamentos e pela ajuda na elaboração deste trabalho, além da motivação constante.

Agradeço também os demais colegas do CPBMF e da Quatro G Ltda. Pesquisa & Desenvolvimento, pelo carinho, companheirismo, ajuda e por serem exemplo concreto de equipe de trabalho. Especialmente aqueles amigos pela força, motivação, amizade e ajuda na realização deste trabalho durante os experimentos e no dia-a-dia.

Ao meu namorado, Antônio Carlos Deon Serres, agradeço pelo amor, força e compreensão nos momentos difíceis, de nervosismo e de ansiedade.

Aos meus pais, Ilgo José Wink Filho e Gisele Santoro Lamb, agradeço pelo amor, carinho e dedicação, e pelo exemplo de caráter e valores que levarei para o resto da vida.

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo CNPq.

## RESUMO

As enzimas L-asparaginase do tipo II catalisam a hidrólise de L-asparagina a L-aspartato e amônia e, em menor quantidade, a hidrólise de L-glutamina. *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* são as principais origens das L-asparaginases II utilizadas como agentes terapêuticos no tratamento da leucemia linfoblástica aguda infantil. Entretanto, sua atividade de glutaminase tem sido relatada, causando graves efeitos colaterais. Felizmente, a L-asparaginase II obtida de *Erwinia carotovora* possui baixa atividade de glutaminase, representando uma importante terapia alternativa. Neste trabalho é descrita a clonagem, expressão, purificação e determinação dos parâmetros cinéticos em estado estacionário para duas construções de L-asparaginase II de *E. carotovora*: com (AspSP) e sem peptídeo-sinal (AspMP). AspMP foi purificada à homogeneidade por um protocolo de uma etapa com 81% de rendimento, enquanto que AspSP por um protocolo de duas etapas com 35% de rendimento. Os valores de  $K_m$  e  $k_{cat}$  para as atividades de L-asparaginase e de L-glutaminase foram determinados para ambas as proteínas. A análise de especificidade para os substratos indicou que a L-asparagina é o melhor substrato que a L-glutamina para a AspSp quando comparado à AspMP. Entretanto, a AspMP é produzida por um protocolo de purificação simples que fornece um alto rendimento da enzima. Este processo pode ser adaptado para uma produção em larga escala e ser interessante para as pesquisas e companhias biofarmacêuticas.

Palavras-chave: L-asparaginase II; *E. carotovora*; Expressão heteróloga; Terapia anticâncer; Proteína terapêutica.

## ABSTRACT

L-Asparaginase type II enzymes catalyze the hydrolysis of L-asparagine to L-aspartate and ammonia, and to a lesser extent the hydrolysis of L-glutamine. *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi* are the main sources of L-asparaginases II used as therapeutic agents in the treatment of acute childhood lymphoblastic leukaemia. However, their glutaminase activity has been implicated in causing serious side effects. Fortunately, L-asparaginase II from *Erwinia carotovora* has significantly lower glutaminase activity and may represent an important alternative therapy. Here we describe cloning, expression, purification and determination of steady-state kinetic parameters for two constructs of *E. carotovora* L-asparaginase II: with (AspSP) and without the signal peptide (AspMP). AspMP was purified to homogeneity by a single-step protocol with 81 % yield, and AspSP by a two-step protocol with 35 % yield. The  $K_m$  and  $k_{cat}$  values for L-asparaginase and L-glutaminase activities were determined for both proteins. Analysis of specificity for competing substrates indicates that L-asparagine is a better substrate than L-glutamine for AspSP as compared to AspMP. However, the latter is produced by a simpler purification protocol and at higher yield. This process can be amenable to large scale production and be of interest to researchers and biopharmaceutical companies.

Keywords: L-asparaginase II; *E. carotovora*; Heterologous expression; Cancer therapy; Therapeutic protein.



## ABREVIACOES

**ALL** – Leucemia Linfoblástica aguda

***E. coli*** – *Escherichia coli*

***E. carotovora*** – *Erwinia carotovora*

***E. chrysanthemi*** – *Erwinia chrysanthemi*

**IPTG** – Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosideo

**kDa** – quilo Dalton

**LB** – Meio de cultura Luria - Bertani

***lon*** – gene que codifica uma protease dependente de ATP

***omp T*** – gene que codifica uma protease de membrana

**OD<sub>600</sub>** – Densidade tica a 600 nm

**PCR** – Reao em cadeia da polimerase

**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro

**RNA<sub>t</sub>** – RNA transportador

***rne131*** – gene que codifica uma enzima RNase

**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio

**SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

**TB** – Meio de cultura Terrific Broth

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda .....	10
1.2 Asparaginases bacterianas.....	11
1.2.1 Estrutura da Proteína .....	12
1.2.2 Mecanismo de Ação .....	13
1.2.3 Toxicidade e Hipersensibilidade .....	13
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	15
3.1 Objetivo Geral .....	15
3.2 Objetivos Específicos .....	15
<b>4. MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL</b> .....	16
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
<b>ANEXO I</b> .....	46
<b>ANEXO II</b> .....	49
<b>ANEXO III</b> .....	50
<b>ANEXO IV</b> .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos), que tem como principal característica o acúmulo de células jovens (blastos) anormais na medula óssea, substituindo as células sanguíneas normais. Os principais sintomas da leucemia decorrem do acúmulo destas células na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção dos glóbulos vermelhos, dos glóbulos brancos e das plaquetas, causando anemia, infecções e hemorragias, respectivamente. Depois de instalada, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico e a classificação da leucemia, porque ao não ser tratada é rapidamente fatal (<http://www.inca.gov.br>).

Segundo as Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil em 2006, publicadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), as leucemias atingiram cerca de 5.330 homens e 4.220 mulheres (<http://www.inca.gov.br>). O tipo de leucemia mais frequente em crianças é a leucemia linfoblástica aguda (*Acute Lymphoblastic Leukemia – ALL*), enquanto que a leucemia mielóide aguda é mais comum nos adultos (<http://www.inca.gov.br>). A ALL resulta da proliferação maligna de células linfóides e é diagnosticada em 3000 a 4000 pessoas nos Estados Unidos anualmente, sendo que dois terços destas são crianças (Cortes e Kantarjian, 1995; Parker et al, 1997).

Um progresso extraordinário tem ocorrido no tratamento desta doença. Há quatro décadas a taxa de cura era menor que 10% e, atualmente, está próximo a 80% em crianças (Pui e Evans, 1998). Em contraste, apenas 30 a 40% dos adultos com ALL são curados (Cortes e Kantarjian, 1995; Laport e Larson, 1997). Essa discrepância pode ser atribuída em parte à alta frequência de anormalidades genéticas adversas na leucemia linfoblástica de adultos (Chessells et al, 1998).

Um avanço no tratamento da ALL tem ocorrido pela otimização do uso de drogas já existentes com a introdução de uma combinação de quimioterapias. Entre as drogas utilizadas no tratamento da leucemia estão as enzimas bacterianas asparaginases, que têm sido utilizadas no tratamento da leucemia por aproximadamente 30 anos (Amylon et al, 1999; Avramis e Panosyan, 2005; Ortega et al, 1977). Inicialmente o uso de medicamentos estava focado na indução da remissão da doença em pacientes com ALL (Ortega et al, 1977), porém, estudos

recentes têm explorado a administração de asparaginase por 20 a 30 semanas como consolidação do tratamento da malignidade linfática (Amylon et al, 1999). Além disso, a droga tem sido associada ao metotrexato, um antineoplásico antagonista do ácido fólico, alcançando altos níveis de indução da remissão e prolongando a sobrevivência à leucemia (Lobel et al, 1979).

Protocolos de tratamentos atuais para a ALL utilizam um complexo de múltiplas drogas quimioterápicas (Amylon et al, 1999; Cortes e Kantarjian, 1995; Laport e Larson, 1997; Ortega et al, 1977; Parker et al, 1997). A terapia de indução da remissão com vincristina, um corticosteróide (geralmente a prednisona), asparaginase e um antracíclico, tem sido o suporte principal na fase inicial do tratamento da ALL em crianças (Amylon et al, 1999; Cortes e Kantarjian, 1995; Laport e Larson, 1997; Ortega et al, 1977; Parker et al, 1997). O principal objetivo da terapia em pacientes com leucemia é induzir a completa remissão com a restauração da hematopoiese normal (Cortes e Kantarjian, 1995; Laport e Larson, 1997).

## 1.2 Asparaginases bacterianas

A descoberta de que a asparaginase (*L*-asparagine-amido-hidrolase) possui propriedades antitumorais ocorreu em 1950, no Reino Unido (Broome, 1963; Oettgen et al, 1967). Em 1960, Broome (1963) relatou que a atividade da asparaginase presente no soro do porquinho da índia era responsável por efeitos antitumorais. A asparaginase originária deste animal foi descoberta como sendo responsável pela inibição do crescimento tumoral a partir da sua ação na inibição da incorporação do aminoácido asparagina, o qual causava alterações nas proteínas e no metabolismo dos ácidos nucléicos das células tumorais (Sobin e Kidd, 1966). Alguns anos mais tarde, verificou-se que a asparaginase poderia ser extraída de *Escherichia coli*, proporcionando a produção em larga escala da enzima apropriada para experimentações clínicas (Mashburn e Wriston, 1964), tornando-se eficaz na indústria farmacêutica e causando remissões que foram relatadas em muitos pacientes com ALL que receberam a droga (Oettgen et al, 1967).

Atualmente, a asparaginase disponível comercialmente possui duas origens: *E. coli* e *Erwinia* (*E. chrysanthemi* e *E. carotovora*), embora outras asparaginases bacterianas do gênero *Erwinia* tenham sido caracterizadas pela expressão heteróloga da enzima em células

de *E. coli* (Krasotkina et al, 2004; Kotzia e Labrou, 2005). As duas drogas apresentam mecanismos de ação e toxicidade idênticos, embora suas propriedades farmacocinéticas difiram. As principais drogas existentes no mercado são Elspar<sup>®</sup>, Crasnitin<sup>®</sup> e Kidrolase<sup>®</sup> (de origem de *E. coli*) e Erwinase<sup>®</sup> (de origem de *E. chrysanthemi*). Em muitos países, a asparaginase de apenas uma destas origens é avaliada como terapia de primeira escolha para as malignidades linfoblásticas (Duval et al, 2002; Ollenschläger et al, 1988).

A asparaginase é um produto natural importante que possui um amplo espectro de atividade antitumoral. Além da ALL, a enzima tem sido aplicada no tratamento de muitas outras doenças, como a doença de Hodgkin's, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, linfossarcoma, reticulossarcoma e melanossarcoma (Duval et al, 2002).

Não há relato disponível a respeito da produção comercial desta importante droga antitumoral através de técnicas de DNA recombinante. Atualmente, a asparaginase é produzida industrialmente pela fermentação de cepas de *E. coli* e de *Erwinia*. Infelizmente, a produção de grandes quantidades da enzima com este processo é restrita pela eficiência extremamente baixa da técnica. No Brasil, a asparaginase para a maioria das aplicações clínicas depende da sua importação. O preço extremamente elevado desta droga possui uma limitação severa na sua aplicação clínica aos pacientes. Sendo assim, a procura por sistemas que apresentem níveis elevados de expressão de asparaginase e a construção de genes apropriados para esta enzima através de técnicas de DNA recombinante é notavelmente atrativa (Kozak, Jaskólski, Röhm, 2000; Guo et al, 2000).

### **1.2.1 Estrutura da Proteína**

As asparaginases bacterianas (EC 3.5.1.1) são proteínas com alto peso molecular. A forma funcional da enzima existe como um tetrâmero com subunidades idênticas, com massa molecular alcançando de 140 a 160 kDA (Aghaiypour, Wlodawer, Lubkowski, 2001; Aung et al, 2000; Kozak et al, 2002). Cada monômero consiste em aproximadamente 330 resíduos de aminoácidos que formam 14 folhas  $\beta$ -pregueadas e 8  $\alpha$ -hélices. Cada um dos quatro sítios ativos está localizado entre os domínios N e C terminais de dois monômeros adjacentes. Assim, o tetrâmero asparaginase pode ser tratado como um dímero de dímeros (Kozak et al, 2002).

### **1.2.2 Mecanismo de Ação**

As células humanas necessitam de um suprimento estável do aminoácido asparagina para produzir proteínas. A maioria das células utiliza a asparagina sintetase para sintetizar sua própria asparagina. A enzima adiciona uma amina no aspartato, formando o grupo amida característico da asparagina. Assim, a maioria das células pode sintetizar seus próprios suprimentos do aminoácido, não necessitando obtê-lo da dieta. Muitas células sanguíneas, entretanto, não sintetizam sua própria asparagina, dependendo principalmente do suprimento da via sanguínea como fonte deste aminoácido (Müller e Boos, 1998).

Diferente das células normais, as células malignas geralmente possuem poucos níveis de asparagina sintetase e não conseguem regular positivamente o gene desta enzima durante as condições de depleção de asparagina, sintetizando este aminoácido lentamente (Kiryama et al, 1989; Moola et al, 1994).

O mecanismo antileucêmico da asparaginase conta com a conversão da asparagina em aspartato (Kiryama et al, 1989; Moola et al, 1994; Oettgen et al, 1967; Richards e Kilberg, 2006). Ela hidrolisa o aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia, através de um mecanismo cinético em que a asparagina é, primeiro, adicionada à enzima, liberando amônia e formando a enzima aspartil. Este intermediário pode reagir com a água para formar o ácido aspártico (Aghaiypour, Wlodawer, Lubkowski, 2001). Desse modo, a depleção de asparagina da corrente sanguínea conduz à destruição das células tumorais, por tornarem-se incapazes de completar a síntese protéica e, conseqüentemente, sintetizar suas próprias proteínas (Oettgen et al, 1967; Sobin e Kidd, 1966).

### **1.2.3 Toxicidade e Hipersensibilidade**

A resposta terapêutica dos pacientes raramente ocorre sem alguma evidência de toxicidade. Os principais efeitos colaterais relacionados com a asparaginase podem manifestar-se com uma larga escala de sintomas clínicos, como disfunção hepática, pancreatite, diabetes, leucopenia, ataques neurológicos e anormalidades na coagulação que podem levar à trombose intracranial ou hemorragia (Duval et al, 2002; Oettgen et al, 1970).

A principal limitação do uso da asparaginase de *E. coli* é o desenvolvimento de hipersensibilidade, a qual alcança desde reações alérgicas leves a choque anafilático (Moola et al, 1994). A hipersensibilidade está associada com a produção de anticorpos à droga, podendo reduzir a atividade da asparaginase, causando o aumento do aminoácido asparagina e o possível desenvolvimento de resistência a esse medicamento (Asselin et al., 1993; Oettgen et al, 1970).

A asparaginase também contribui para a atividade da glutaminase, reduzindo rapidamente as concentrações de glutamina circulante no plasma dos pacientes, porque esta é convertida em ácido glutâmico e amônia (Ollenschläger et al, 1988). A enzima hidrolisa este aminoácido, porém com menor eficiência, o qual é o precursor da biossíntese *de novo* da asparagina no fígado, uma reação que é catalisada pela enzima asparagina sintetase (Avramis e Panosyan, 2005; Graham, 2003; Asselin, et al, 1993). Algumas pesquisas sugerem que a toxicidade da asparaginase é parcialmente atribuível à atividade da glutaminase dessas proteínas. Neurotoxicidade e hepatotoxicidade têm sido relatadas na depleção de glutamina celular e no acúmulo de ácido glutâmico (Howard e Carpenter, 1972; Ollenschläger et al, 1988).

Foi demonstrado que a enzima de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* é uma alternativa para o tratamento da ALL por apresentar menores efeitos colaterais quando utilizada na terapia antineoplásica, comparada às asparaginases derivadas de *E. coli* ou de *Erwinia chrysanthemi* (Krasotkina et al, 2004). Além disso, a enzima de *E. carotovora* possui uma menor atividade da glutaminase, sendo significativamente menor do que a apresentada pelas enzimas de *E. coli* e de *E. chrysanthemi*. Isto é particularmente importante, uma vez que a atividade da glutaminase nas preparações terapêuticas das asparaginases tem sido implicada na causa dos efeitos colaterais (Hawkins et al, 2004).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo principal a comparação da expressão em *Escherichia coli*, purificação e atividade de duas construções de asparaginase de *E. carotovora*, com e sem a seqüência peptídeo-sinal, para posterior produção da enzima antileucêmica asparaginase. Esse processo representa um passo importante na produção em larga escala da asparaginase recombinante em cepas de *E. coli* visando a redução dos custos de importação deste medicamento.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Amplificação por PCR do gene *ErA* de *E. carotovora subsp. atroseptica* a partir do DNA genômico, utilizando-se *primers* contendo os sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *BamHI*: uma amplificação da seqüência de DNA que codifica a proteína asparaginase incluindo seu peptídeo-sinal (AspSP) e a outra que codifica a proteína madura de asparaginase, sem a seqüência peptídeo-sinal (AspMP).
- Clonagem dos genes no vetor pCR<sup>®</sup>-Blunt (Invitrogen);
- Subclonagem no vetor de expressão pET30a(+) (Novagen);
- Expressão de AspSP e AspMP em células de *E. coli*.
- Purificação das duas proteínas recombinantes por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
- Seqüenciamento dos aminoácidos da porção N-terminal de AspSP e AspMP.
- Determinação da atividade biológica das proteínas recombinantes.
- Determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$ ,  $k_{cat}$ ) para os substratos asparagina e glutamina.



#### **4. MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL**

Este manuscrito foi submetido para a revista **Applied Microbiology and Biotechnology**.

**Comparison between two *Erwinia carotovora* L-Asparaginase II constructions: cloning, heterologous expression, purification, and kinetic characterization**

Priscila Lamb Wink<sup>1,2</sup>; Heique Marlis Bogdawa<sup>3</sup>; Luiz Augusto Basso<sup>1,2\*</sup>; Diógenes Santiago Santos<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Tecnopuc, Prédio 92A, Partenon, Porto Alegre, 90619-900, Brazil / Phone: +55 51 33203629.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde - PUCRS. Av. Ipiranga, 6690, Partenon, Porto Alegre, 90610000, Brazil / Phone: + 55 51 33203318.

<sup>3</sup> Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento LTDA. Av. Ipiranga, 6681, Tecnopuc, Prédio 92A, Partenon, Porto Alegre, 90619900, Brazil / Phone: +55 51 33526560.

\*To whom correspondence may be addressed: Tel/Fax: +55 51 33203629; Diógenes S. Santos (diogenes@pucrs.br) or Luiz A. Basso (luiz.basso@pucrs.br)

## Abstract

L-Asparaginase type II enzymes catalyze the hydrolysis of L-asparagine to L-aspartate and ammonia, and to a lesser extent the hydrolysis of L-glutamine. *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi* are the main sources of L-asparaginases II used as therapeutic agents in the treatment of acute childhood lymphoblastic leukaemia. However, their glutaminase activity has been implicated in causing serious side effects. Fortunately, L-asparaginase II from *Erwinia carotovora* has significantly lower glutaminase activity and may represent an important alternative therapy. Here we describe cloning, expression, purification and determination of steady-state kinetic parameters for two constructs of *E. carotovora* L-asparaginase II: with (AspSP) and without the signal peptide (AspMP). AspMP was purified to homogeneity by a single-step protocol with 81 % yield, and AspSP by a two-step protocol with 35 % yield. The  $K_m$  and  $k_{cat}$  values for L-asparaginase and L-glutaminase activities were determined for both proteins. Analysis of specificity for competing substrates indicates that L-asparagine is a better substrate than L-glutamine for AspSP as compared to AspMP. However, the latter is produced by a simpler purification protocol and at higher yield. This process can be amenable to large scale production and be of interest to researchers and biopharmaceutical companies.

Keywords: L-asparaginase II; *E. carotovora*; Heterologous expression; Cancer therapy; Therapeutic protein.

## Introduction

L-Asparaginase enzymes (L-Asparagine amidohydrolase; EC 3.5.1.1) catalyze the hydrolysis of L-Asparagine (L-Asn) to L-Aspartate (L-Asp) and ammonia (NH<sub>3</sub>), and to a lesser extent the hydrolysis of L-Glutamine (L-Gln) to L-Glutamate (L-Glu). Two types of bacterial L-asparaginases have been identified: type I and type II (Campbell et al. 1967). Type I L-asparaginases are expressed constitutively in the cytoplasm and catalyze the hydrolysis of both L-Asn and L-Gln, whereas type II L-asparaginases are expressed under anaerobic conditions in the periplasmic space of the bacterial membranes and display higher specificity for L-Asn hydrolysis (Cedar and Schwartz 1968; Campbell et al. 1967). Type II L-asparaginases, in particular, present tumor inhibitory activity and have thus been extensively studied (Cedar and Schwartz 1968; Campbell et al. 1967). Tumor-inhibitory L-asparaginases have also been isolated from a number of bacterial sources including *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter glutaminasificans*, *Pseudomonas putida*, *Wolinella succinogenes*, *Helicobacter piloris*, and others. However, the enzymes from *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Erwinia* sp. have been more frequently used in cancer therapy (Avramis and Panosyan 2005; Broome 1968; Oettgen et al. 1970) due to their higher substrate affinity (Schwartz et al. 1966) and favorable factors affecting the clearance rate of these enzymes from the system (Broome 1965). *E. coli* and *Erwinia chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) are the main sources of L-asparaginases II, which have identical mechanisms of action but different pharmacokinetic properties (Duval et al., 2002). *E. coli* L-asparaginase induce more coagulation abnormalities but shown to be superior to *E. chrysanthemi* L-asparaginase for the treatment of childhood lymphoid malignancies (Duval et al. 2002). The main side effects are liver dysfunction, pancreatitis, diabetes, leucopenia, neurological seizures, and coagulation abnormalities that may lead to intracranial thrombosis or hemorrhage (Oettgen et al. 1970; Duval et al. 2002). Another limiting factor of *E. coli* L-asparaginase II is the development of hypersensitivity, which ranges from mild allergic reactions to anaphylactic shock (Schwartz et al. 1966). Because L-asparaginases II from *E. coli* and *Erwinia* possess different immunological specificities they offer an important alternative therapy if a patient becomes hypersensitive to one of the enzymes (Lee et al. 1989).

The bacterial enzyme L-asparaginase II has been used in combination with other drugs in acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment for approximately 30 years (Amylon et al. 1999; Avramis and Panosyan 2005; Ortega et al. 1977). The antileukemic effect of L-Asparaginase II is believed to result from the depletion of circulating L-Asn (Kiryama et al.

1989; Moola et al. 1994; Oettgen et al. 1967; Richards and Kilberg 2006). As certain tumor cells have decreased or absent activity of Asparagine synthase, they depend on externally supplied L-Asn for protein synthesis and the decreased supply of L-Asn in the blood results in cancer cell death (Müller and Boos 1998). L-Asparaginase II is also used to treat Hodgkin's disease, acute myelocytic leukemia, lymphosarcoma, reticulosarcoma, and melanosarcoma (Duval et al. 2002).

The interest in *Erwinia carotovora* (*E. carotovora*) L-asparaginase II stems from its significantly lower glutaminase activity as compared to that exhibited by *E. coli* and *E. chrysanthemi* enzymes. This is particularly important, since the glutaminase activity of therapeutic preparations of L-asparaginases II has been implicated in causing side effects such as serious liver disorders, acute pancreatitis, hyperglycemia and immunosuppression (Hawkins et al. 2004; Krasotkina et al. 2004). Interestingly, no report using the sequence of *E. carotovora* L-asparaginase II mature protein and recombinant DNA technology for its heterologous expression aiming at commercial production are available. The commercially available L-asparaginases are produced by non-recombinant bacteria fermentations in which the production of large quantities is restricted by the extremely low efficiency of the process (Guo et al. 2000). In order to study the best conditions for the production of *E. carotovora* L-asparaginase II production in *E. coli*, we compared the expression, purification and activity of two L-asparaginase constructions. These constructions were *E. carotovora* L-asparaginase II with and without its signal sequence. This process represents an important step towards large-scale production of recombinant *E. carotovora* L-asparaginase II in *E. coli* cells.

## **Material and Methods**

### ***Amplification, cloning, and expression of E. carotovora L-asparaginase II***

Two PCR amplifications of genomic *E. carotovora* DNA, from our laboratory bacterial collection, were carried out using specific primers containing *Nde*I and *Bam*HI restriction sites: one amplification for the DNA sequence encoding L-asparaginase II (*ErA*) including its native signal sequence (AspSP) and the other without its native signal sequence (AspMP). The PCR products (1041 and 1002 bp, respectively) were purified from agarose

gel, cloned into the pCR-Blunt® vector (Invitrogen) and subcloned into the pET-30a(+) expression vector (Novagen) using the *NdeI* and *BamHI* restriction enzymes (Boehringer Mannheim). In order to confirm the identity and absence of PCR-introduced mutations in the cloned genes, the *ErA* genes were sequenced by automatic sequencing. *E. coli* C41(DE3) and BL21(DE3) electrocompetent cells were transformed with the recombinant pET30a(+) containing the L-asparaginase II genes (AspSP and AspMP, respectively) and grown on LB agar plates containing 30 µg mL<sup>-1</sup> of kanamycin. It should be pointed out that the protocol of recombinant protein expression described here represents just one, out of several experimental conditions used to optimize the assay. The soluble fractions were analyzed by 12 % SDS-PAGE (Laemmli 1970).

### ***Expression of AspSP***

To analyze the L-asparaginase II expression in the periplasmic space, a osmotic shock protocol was used (Ausubel et al. 1989), in which *E. coli* C41(DE3) electrocompetent cells were transformed with the recombinant pET30a(+) containing the AspSP gene. A single colony was inoculated in 50 mL of LB medium containing 30 µg mL<sup>-1</sup> kanamycin and grown in shaker flasks at 180 rpm at 37 °C to an OD<sub>600</sub> of 0.4-0.6. The cells were grown for an additional 6 h after induction with 1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Cells were harvested by centrifugation at 20,800g for 5 minutes at 4 °C. The cell pellet was resuspended in 40 mL of 30 mM Tris-HCl, 20 % sucrose, pH 8. Then 0.8 mL 0.5 M EDTA, pH 8 was added and the sample stirred slowly at room temperature for 10 minutes. The cells were collected by centrifugation at 4 °C for 10 minutes at 10,000g. The pellet was resuspended in 400 mL of ice-cold 5 mM MgSO<sub>4</sub> and the cell suspension stirred slowly for 10 minutes on ice, and centrifuged at 10,000g for 10 minutes at 4 °C. The supernatant (periplasmic fraction) was concentrated to 4 mL and analyzed by 12% SDS-PAGE. The pellet (cytoplasmic space) was resuspended in 4 mL buffer and disrupted by sonication, centrifuged at 48,000g for 30 min at 4 °C, and the supernatant analyzed by 12 % SDS-PAGE. To verify the expression of AspSP into the culture medium, 50 mL of LB medium were grown as described above and 6 h after induction with IPTG, the supernatant was obtained by centrifugation at 20,800g for 5 minutes at 4 °C, concentrated to 4 mL, and analyzed by 12% SDS-PAGE.

### ***Expression of AspMP***

*E. coli* BL21(DE3) electrocompetent cells were transformed with the recombinant pET30a(+) containing the AspMP gene. Cell culture and IPTG induction of recombinant protein were as for AspSP. One mL of cell culture was harvested by centrifugation at 18,000g for 1 min and the pellet resuspended in 0.5 mL of 50 mM Tris/HCl pH 8 was disrupted by sonication. The samples were centrifuged at 18,000g for 20 min at 4 °C and the soluble fraction was analyzed by SDS-PAGE.

### ***Purification***

To purify the recombinant proteins, a single colony was inoculated in 50 mL of LB medium containing 30 µg mL<sup>-1</sup> kanamycin and grown in shaker flasks at 180 rpm at 37 °C up to an OD<sub>600</sub> of 1. Ten mL of this cell culture were used to inoculate 5 flasks containing 500 mL of LB medium. After the cultures have reached an OD<sub>600</sub> of 0.4 - 0.6 the expression was induced with 1 mM of IPTG. The cells were grown for additional 6 h after induction and harvested by centrifugation at 15,900g for 30 min at 4 °C and stored at -20°C. The cells were resuspended (1 g cells/10 mL buffer) in 20 mM potassium phosphate buffer pH 5.5 (buffer A), disrupted by sonication, and centrifuged at 48,000g for 30 min at 4 °C. The supernatant was incubated with 1 % (w/v) of streptomycin sulfate for 30 min at 4 °C, centrifuged at 48,000g for 30 min, and the resulting supernatant dialyzed twice against 2 L of buffer A. The purification protocol for the two proteins was performed using the ÄKTA System (GE Healthcare) and performed at 4 °C. Samples from dialysis were clarified by centrifugation and the supernatants were loaded on a HiPrep 16/10 SP XL cation exchange chromatography column previously equilibrated with buffer A. The nonadsorbed proteins were washed out with 5 column volumes (CVs) of buffer A, and the adsorbed proteins were eluted with a linear pH gradient, pH 5.5 to 8.5, of 20 mM potassium phosphate buffer using 20 CVs. The eluted fractions containing the purified recombinant AspMP enzyme were pooled and stored at -20 °C. On the other hand, for AspSP recombinant protein, the eluted fractions were concentrated and loaded on Sephacryl S-200 HR column previously equilibrated with 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.5, and the eluted fractions containing the purified AspSP enzyme were

pooled and stored at -20 °C. Chromatographic protein fractions and homogeneity of recombinant AspMP and AspSP proteins was evaluated by 12 % SDS-PAGE stained with either Comassie Blue or Silver (Owl Silver Stain, Owl Separation Systems). Protein concentration was determined by the Bradford's method (Bradford et al. 1976) using the BIO-RAD protein assay kit and bovine serum albumin as standard.

### ***N-terminal amino acid sequence analysis***

N-terminal amino acid residues of both AspMP and AspSP homogeneous recombinant L-asparaginase II proteins were identified by the automated Edman degradation method on a PPSQ-23 protein peptide sequencer (Shimadzu Co. Japan).

### ***Activity assays and determination of steady-state kinetic parameters***

The assay employed to evaluate L-asparaginase II activity of fractions of the purification protocol steps was as described by Balcao et al. (2001) with minor modifications. The final 1.5 mL reaction mixture contained 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, 1 mM L-asparagine, 0.15 mM 2-oxoglutarate, 1 mM NADH and 8 units of glutamate dehydrogenase from bovine liver. The mixture was incubated in a cuvette at 25 °C for three minutes and the activity assay was initiated by the addition of 20 nM of purified *E. carotovora* L-asparaginase II. The continuous absorbance change at 370 nm ( $\epsilon=2857 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for NADH) was monitored for 2 minutes at 25 °C.

The assay employed to measure L-Asn and L-Gln hydrolysis catalyzed by homogeneous recombinant AspMP and AspSP proteins was the direct method described by Krasotkina et al. (2004), with minor modifications. This method is based on the measurement of the decrease in absorbance of the  $\gamma$ -amide bond of a substrate at 215 nm ( $\epsilon=102.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). The reaction was carried out in a 1.5 mL quartz cuvette containing 198.9 nM AspSP or AspMP for asparaginase activity measurements and 662.9 nM AspSP or AspMP for glutaminase activity measurements, and one of the substrates (L-Asn or L-Gln) at varying concentrations (from 1 to 20 mM) in 0.02 M Potassium phosphate buffer at pH 7.0 at 37 °C.



The kinetic parameters  $k_{cat}$  and  $K_m$  were calculated by non-linear regression analysis fitting the experimental steady-state data to the Michaelis-Menten equation,  $v=V_{max}[S]/(K_m+[S])$ , where  $k_{cat}=V_{max}/[E]$ . Turnover numbers were calculated on the basis of one active site per 34.5 kDa of subunit molecular mass.

## Results

### *DNA sequence amplification and cloning*

A 1041 bp PCR amplification fragment consistent with *ErA* gene containing the region which codifies for its signal peptide (AspSP) and a 1002 bp PCR amplification fragment consistent with *ErA* gene lacking this region (AspMP) were detected on agarose gel (data not shown). The fragments were subcloned into pET30a(+) vector through the *NdeI* and *BamHI* restriction sites. The correct construction of both plasmids was confirmed by nucleotide sequence analysis.

### *Recombinant protein expression*

Heterologous expression of *E. carotovora* AspMP in *E. coli* BL21(DE3) host cells could be achieved in the presence and absence of IPTG induction as shown by a strong protein band of approximately 39 kDa as determined by SDS-PAGE analysis of the soluble fraction (Figure 1). After the osmotic shock, the expression of recombinant *E. carotovora* AspSP in *E. coli* C41(DE3) host cells was observed in the periplasmic space and in the culture medium at similar quantities, and in the cytoplasm at negligible level (Figure 2). The recombinant AspMP was observed only in the cytoplasm, as expected.

### ***Purification***

The amount of cells obtained from 2.5 L of LB medium were: 7 g for AspSP and 2.6 g for AspMP. The purification of AspSP was achieved by a two-step purification protocol. Protein elution of recombinant AspSP loaded on a Hicap 16/10 SP XL cation exchange column employed pH gradient with the recombinant protein eluting at pH 7.0. The pooled fractions were loaded on a Sephacryl S-200 HR gel filtration column. The pooled protein fractions were analyzed by SDS-PAGE (Figure 3A). On the other hand, purification of AspMP could be achieved by a single-step protocol using Hicap 16/10 SP XL cation exchange column and pH gradient elution profile (Figure 3B). Apparently no contaminants were detected with Coomassie Blue staining. In addition, SDS-PAGE analysis with silver staining attests the high degree of homogeneity for both proteins (Figure 3C). Approximately 0.63 mg of homogeneous recombinant AspSP and 2.6 mg of homogeneous recombinant AspMP were obtained from 1 g of cells. The yield of recombinant active protein was 80.1 % for AspMP and 35.1 % for AspSP (Table 1). The specific activity of purified recombinant L-asparaginases II was calculated by measuring the rate of ammonia formation, by coupling with glutamate dehydrogenase. Values of 59.54 and 62.01 U mg<sup>-1</sup>, were obtained for AspMP and AspSP, respectively (Table 1).

### ***N-terminal amino acid sequencing***

The first eleven N-terminal amino acid residues for the two recombinant L-asparaginases II were identified as AENLPNIVILA by the EDMAN degradation method. This result confirms the identity of both homogeneous recombinant mature proteins as L-asparaginase II, and the removal of the N-terminal signal peptide from AspSP construct.

### ***Kinetic analysis***

The substrate specificity was assessed for L-Asn and L-Gln by steady-state kinetic analysis employing a direct assay that monitored the decrease in absorbance of the  $\gamma$ -amide bond upon carboxylic acid formation (Table 2). The  $K_m$  values for L-Asn were 0.16 mM for AspSP and 1.1 mM for AspMP; and the  $K_m$  values for L-Gln were determined as 2.6 mM for AspSP and 4.4 mM for AspMP. The catalytic constant values for L-asparaginase activity was  $160 \text{ s}^{-1}$  for both enzymes, and for L-glutaminase activity were  $6.0 \text{ s}^{-1}$  for AspSP and  $7.1 \text{ s}^{-1}$  for AspMP.

### **Discussion**

To the best of our knowledge, the work here presented is the first report on cloning, expression in *E. coli*, and purification of the mature recombinant *E. carotovora* L-asparaginase II (AspMP) protein. Previous reports cloned the DNA sequence of *E. carotovora* L-asparaginase II containing the signal sequence (Kotzia and Labrou 2005; Krasotkina et al. 2004). Our aim was to compare expression and activity of two constructs of *E. carotovora* L-asparaginase II (with and without signal peptide) to optimize the process for large scale production. As AspMP does not have a signal peptide sequence, its expression was restricted to the cytoplasm. Since bacterial L-asparaginases are extracellular, it has been proposed that a precursor should contain a signal peptide sequence to direct its transport across the periplasmic membrane (Kotzia and Labrou 2005). Our results demonstrate that AspSP construct without the signal peptide was present in the periplasm as well as in the extracellular medium, and with the signal peptide at negligible levels in the cytoplasm (Figure 2). Secreted proteins can leak from the periplasmic space into the culture medium possibly due to an increased permeability of the cell membrane. Small proteins secreted into the periplasm are frequently released into the culture medium (Tong et al. 2000) as observed here for AspSP. Although this mechanism of secretion of some overexpressed proteins is not fully known, it is assumed that it has to do with the selective passage of the protein through the outer membrane (Shokri et al. 2003).

The N-terminal amino acid sequencing showed the removal of the N-terminal signal peptide from AspSP. We thus deemed more convenient to express the recombinant L-asparaginase protein in one compartment and avoid leakage to extracellular medium. Accordingly, we constructed L-asparaginase without the signal peptide sequence (AspMP). Amino acid sequencing (AENLPNIVILA) showed that the N-terminal methionine was removed from the AspMP. A common type of co-/post-translational modification of proteins synthesized in prokaryotic cells is modification at their N-termini. Methionine aminopeptidase catalyzed cleavage of initiator methionine is usually directed by the penultimate amino acid residues with the smallest side chain radii of gyration (glycine, alanine, serine, threonine, proline, valine, and cysteine) (Lowther and Matthews 2000). This substrate preference of methionine aminopeptidases is opposite to the “N-end rule” for protein degradation, in which methionine aminopeptidase will not remove an N-terminal methionine if a “destabilizing” amino acid will be exposed (Varshavsky 2008). As the clinical use of L-asparaginases II can be limited by its *in vivo* inactivation by proteolysis (Guo et al 2000), it is thus expected that the recombinant AspMP here described would have favorable *in vivo* half-life since the N-terminal amino acid residue after methionine removal is alanine – a stabilizing amino acid residue. Moreover, the N-terminal amino acid sequence of AspMP is identical to recombinant AspSP protein having the signal peptide removed. In addition, as the main sources of L-asparaginases II commercially available are produced by non-recombinant fermentation of *E. coli* and *E. chrysanthemi* and have thus their signal peptide sequence removed, the construct here described for AspMP may represent an attractive alternative for large scale production of *E. carotovora* L-asparaginases II. It should also be pointed out that the N-terminal amino acid sequencing showed that AspMP was separated from its *E. coli* counterpart, which has an important bearing on *E. carotovora* L-asparaginases II preparation since these two enzymes have distinct immunological specificities and provide alternative therapy if a patient develops hypersensitivity to either L-asparaginases II (Bascomb and Bettelheim 1976).

The estimated molecular mass for the two L-asparaginases II without its signal peptide is 34.5 kDa in contrast to the approximately 39 kDa observed by SDS-PAGE analysis. Owing to its very alkaline character (estimated pI value of 9.04) the proteins may run differently (slower) on SDS-PAGE than would be expected based on their known molecular mass (Walker 1996). There appears to be two minor components present in the AspMP preparation (Figure 3). As previously reported (Krasotkina et al. 2004), these low-molecular-mass contaminants were probably proteolytic products of L-asparaginase II, which accumulated during storage of the enzyme solutions. Incidentally, no cocktail of protease inhibitors were

employed in the purification process because their presence in a therapeutic protein must be avoided. Notwithstanding, the AspMP preparation is clearly superior to AspSP one (Figure 3).

An additional favorable feature for using the L-asparaginase II construction without the signal peptide is that it can be purified by a single-chromatographic-step protocol as compared to two steps for AspSP. A two-step purification protocol for recombinant *E. carotovora* L-asparaginase II has been described in which a cation-exchange chromatography is followed by an affinity chromatography with immobilized L-Asn and the protein eluted with buffer containing 10 mM L-Asn (Kotzia and Labou 2005). However, no active protein yield was reported by these authors. Recombinant *E. carotovora* L-asparaginase II has been purified by a one-step purification protocol with 72 % yield of active protein (Kratsokina et al 2004), however the construct was protected by patent. Notwithstanding, the yield of active recombinant AspMP described here was 81 % (Table 1), which is superior than reported by Kratsokina et al. (2004). In addition, the yield of active recombinant AspSP employing the protocol here described was 31 %, which strengthen the proposal of using the AspMP construct for further attempts at large scale production.

The active assay coupled with glutamate dehydrogenase is based on a continuous assay following hydrolysis of L-asparagine and release of ammonia, which is in turn incorporated into 2-oxoglutarate by glutamate dehydrogenase with concomitant oxidation of NADH to NAD<sup>+</sup>. The decrease in NADH concentration can be monitored spectrophotometrically at 370 nm, accompanying the conversion of released ammonia, NADH and 2-oxoglutarate to NAD<sup>+</sup> and L-glutamate. We considered this method more convenient than the assay using the Nessler's reagent (Wriston and Yellin 1973), since continuous methods are easier to establish the assay conditions and are usually faster to obtain results. In this report we found very similar specific activities for AspSP and AspMP, 62.0 and 59.5 U mg<sup>-1</sup>, respectively (Table 1). These values are approximately 10-fold lower as compared to a method using the Nessler's reagent to measure *E. carotovora* L-asparaginase II enzyme activity (Kratsokina et al 2004), and cannot be compared to a measurement using the same method simply because this value was not provided (Kotzia and Labrou 2005). Notwithstanding, the coupled assay was only employed to accompany the degree of purification of recombinant *E. carotovora* L-asparaginase II and a direct method was chosen to determine the steady-state parameters described below.

Among the variety of assays for L-asparaginase II activity there are two methods that are sensitive enough for  $K_m$  determination. One of them is the method coupled with glutamate dehydrogenase (Balcao et al. 2001), and the other is a direct continuous method that monitors

the decrease in absorbance at 215 nm of the  $\gamma$ -amide bond of substrate converted to carboxylic acid of product (Krasotkina et al. 2004). The coupled method using glutamate dehydrogenase enzyme could not be employed to determine L-glutaminase activity of *E. carotovora* L-asparaginase II because its product (L-Glutamate) is a substrate for the reverse reaction catalyzed by glutamate dehydrogenase. In contrast, the direct continuous monitoring is easy, sensitive and readily reproducible but can only be employed to measure the purified enzyme activity because of the low  $\epsilon_{215}$  of the  $\gamma$ -amide bond of either asparagine or glutamine.

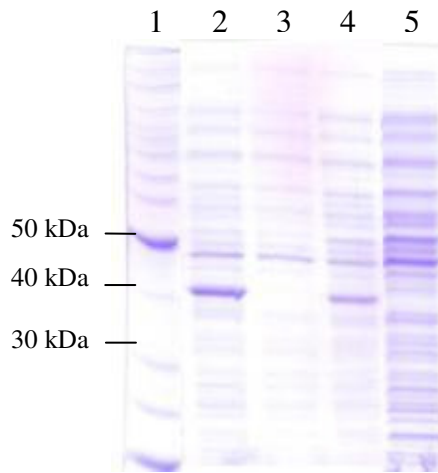
The  $K_m$  value for L-Asn was approximately 7-fold larger for AspMP as compared to AspSP (Table 2), a result that is somewhat intriguing since they should be the same values for a protein obtained from different constructs and purification protocols. However, the  $k_{cat}$  values for hydrolysis of L-Asn are the same for both proteins (Table 2). The  $K_m$  value for L-Gln was approximately 2-fold larger for AspMP as compared to AspSP and similar  $k_{cat}$  values for hydrolysis of L-Gln (Table 2). The larger  $K_m$  value for L-Gln hydrolysis is a favorable feature of AspMP protein as compared to AspSP because a higher concentration of this substrate in the physiological milieu would be required to achieve maximum velocity. Moreover, the  $K_m$  value (4.4 mM) for L-Gln hydrolysis catalyzed by AspMP construct here described is larger than that found for L-asparaginases II from *E. carotovora* (Krasotkin et al. 2004), *E. coli* (Derst et al. 2000) and *E. chrysanthemi* (Moola et al. 1994), which were 3.4, 3.5 and 1.7 mM, respectively. L-Asparaginases with low  $K_m$  values for L-Asn and large values for L-Gln have been reported to be preferable during the course of anti-cancer therapy (Hawkins et al. 2004), since the toxicity of the enzyme is partially attributable to the L-glutaminase activity (Howard and Carpenter 1972). The  $k_{cat}/K_m$  ratio is an apparent second-order rate constant that determines the specificity for competing substrates (Fersht 1999). Accordingly, the ratio of L-Asn  $k_{cat}/K_m$  value over L-Gln  $k_{cat}/K_m$  value indicates that the former is a better substrate for AspSP (432-fold increase) as compared to AspMP (90-fold increase). However, AspMP is produced in higher yield using an one-step protocol.

The experimental approach here described represents an efficient and high-yield method to obtain homogeneous recombinant *E. carotovora* L-asparaginase II with low glutaminase activity. This process can be amenable to large scale production and may be of interest to researchers and biopharmaceutical companies interested in developing biosimilars, which offer a great opportunity to scientific, biotechnological, economical and industrial growth.

## **Acknowledgements**

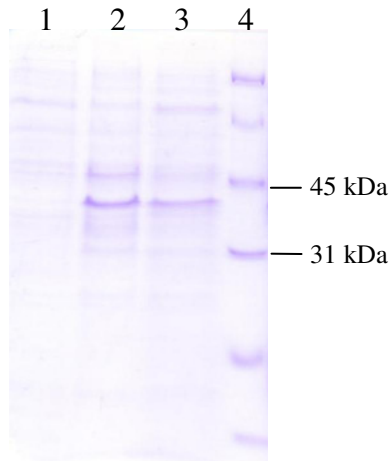
This work was supported by National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES) and Millennium Initiative Program (CNPq), Brazil, to DSS and LAB. DSS and LAB also acknowledge grants awarded by FINEP. DSS (304051/1975-06) and LAB (520182/99-5) are research career awardees from the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq). PLW acknowledges a scholarship awarded by CAPES. The authors also acknowledge Dr. Carlos Bloch Jr. for N-terminal amino acid sequencing.

## Figures

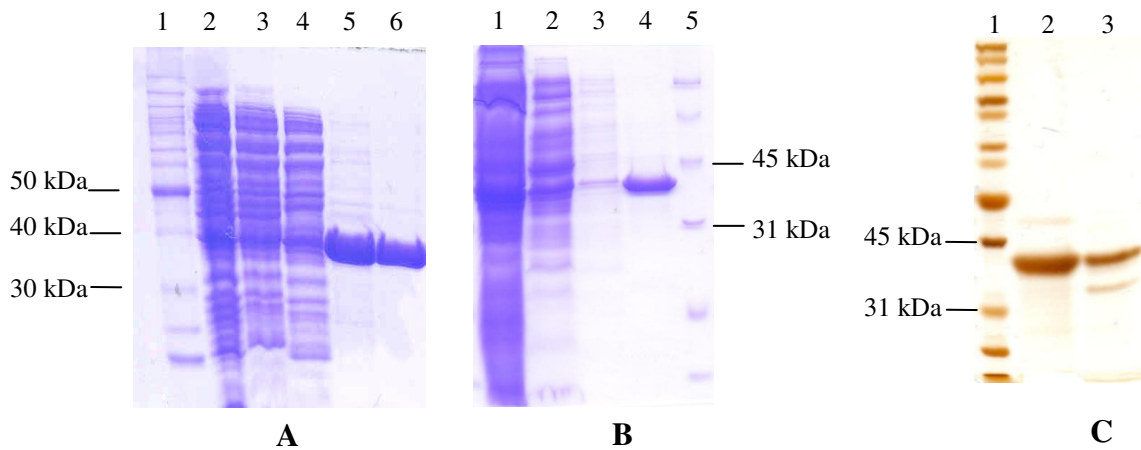


**Figure 1. Analysis of recombinant AspMP expression by SDS-PAGE. SDS-PAGE (12%) analysis showing the expression of AspMP in the soluble fraction of *E. coli* BL21(DE3) host cells. Lane 1: Molecular mass markers (Bench Mark™ Protein Ladder, Invitrogen). Lane 2: host cells containing the recombinant pET30a(+)-AspMP plasmid induced with 1 mM IPTG; lane 3: host cells containing the pET30a(+) plasmid lacking the coding sequence induced with 1 mM IPTG; lane 4: host cells containing the recombinant pET30a(+)-AspMP plasmid without induction and lane 5: host cells containing the pET30a(+) plasmid lacking the coding sequence without induction. The predicted molecular mass for L-asparaginase is 34.5 kDa. The gel was stained with Coomassie Blue.**





**Figure 2. Analysis of recombinant AspSP expression by SDS-PAGE. SDS-PAGE (12 %) analysis showing the expression of AspSP in the periplasm and in the culture medium of *E. coli* strain C41(DE3) host cells 6 hours post-induction.** Lane 1: the cytoplasm fraction showing negligible expression of AspSP (36.5 kDa); lane 2: AspSP expression in the periplasm fraction; lane 3: AspSP expression in the culture medium; and lane 4: Molecular mass markers (Low Range Protein Ladder, BIO-RAD). The predicted molecular mass for L-asparaginase II is 34.5 kDa. The gel was stained with Coomassie Blue.



**Figure 3. SDS-PAGE (12 %) analysis of purification protocol fractions containing L-asparaginase II.** (A) AspSP Purification protocol fractions of SDS-PAGE stained with Coomassie Blue: Lane 1: Protein molecular mass markers (Bench Mark™ Protein Ladder, Invitrogen); lane 2: soluble fraction after cell disruption; lane 3: sample after 1% (w/v) of streptomycin sulfate precipitation; lane 4: sample after dialysis and loaded on cation exchange Hiprep SP XL column; lane 5: pooled fractions of cation exchange chromatography loaded on Sephacryl S-200; and lane 6: homogeneous AspSP (34.5 kDa) after elution from size exclusion chromatography. (B) AspMP Purification protocol fractions of SDS-PAGE stained with Coomassie Blue: Lane 1: soluble fraction after cell disruption; lane 2: sample after 1% (w/v) of streptomycin sulfate precipitation; lane 3: sample after dialysis loaded on cation exchange Hiprep SP XL column; lane 4: homogeneous L-asparaginase II (34.5 kDa) pool eluted from the cation exchange column; and lane 5: Protein molecular mass markers (Low Range Protein Ladder, BIO-RAD). (C) SDS-PAGE stained with Silver of purified AspMP and AspSP proteins: Lane 1: Protein molecular mass markers (Low Range Protein Ladder, BIO-RAD); lane 2: AspMP; and lane 3: AspSP.

## Tables

**Table 1**

Improved purification protocol for recombinant L-asparaginases II AspSP and AspMP from *E. carotovora*

Enzyme	Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg <sup>-1</sup> )	Purification (fold)	Yield (%)
AspSP	Crude extract	91.4	776.9	8.5	1.00	100
	SP XL	3.2	182.1	56.9	6.7	23
	S200	4.4	272.8	62.0	7.3	35
AspMP	Crude extract	53.1	419.5	7.9	1.00	100
	SP XL	6.7	339.1	59.5	8.14	81

The results presented are for a purification protocol from 2.5 g of *E. coli* host cells

**Table 2**

Steady-state kinetic parameters of *E. carotovora* L-asparaginases II AspSP and AspMP<sup>a</sup>

Enzyme	Substrates	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
AspSP	L-asparagine	0.16 ± 0.01	160 (± 1)	9.98 (± 0.62) x 10 <sup>5</sup>
	L-glutamine	2.6 ± 0.4	6.0 (± 0.3)	2.31 (± 0.37) x 10 <sup>3</sup>
AspMP	L-asparagine	1.1 ± 0.1	160 (± 4)	1.45 (± 0.14) x 10 <sup>5</sup>
	L-glutamine	4.4 ± 0.2	7.1 (± 0.1)	1.61 (± 0.08) x 10 <sup>3</sup>

<sup>a</sup> All initial velocities were determined in triplicate.

## References

- Amylon MD, Shuster J, Pullen J, Berard C, Link MP, Wharam M, Katz J, Yu A, Laver J, Ravindranath Y, Kurtzberg J, Desai S, Camitta B, Murphy SB (1999) Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 13: 335-342
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York
- Avramis VI, Panosyan EH (2005) Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clin Pharmacokinet* 44:367-393
- Balcao VM, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Malcata FX, Guisán JM (2001) Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multisubunit immobilization onto highly activated supports. *Biotechnol Prog* 17:537-542
- Bascomb S, Bettelheim KA (1976) Immunological relationships of bacterial L-asparaginases. *J Gen Microbiol* 92:175-182.
- Bradford MM, McRorie RA, Williams WL (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Broome JD (1965) Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. *J Natl Cancer Inst* 35:967-974
- Broome JD (1968) Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase. Effects of the enzyme on asparagine levels in the blood, normal tissues, and 6C3HED lymphomas of mice: differences in asparagine formation and utilization in asparaginase-sensitive and -resistant lymphoma cells. *J Exp Med* 127:1055-1072
- Campbell HA, Mashburn LT, Boyse EA, Old LJ (1967) Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. Their separation, purification, and antitumor activity. *Biochemistry* 6:721-730

- Cedar H, Schwartz JH (1968) Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*. J Bacteriol 96:2043-2048
- Derst C, Henseling J, Röhm KH (2000) 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
- Duval M, Suciu S, Ferster A, Rialland X, Nelken B, Lutz P, Benoit Y, Robert A, Manel AM, Vilmer E, Otten J, Philippe N (2002) Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. Blood 99:2734-2739
- Fersht A (1999) Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. WH Freeman and Company, NY, USA.
- Guo L, Wang J, Yan X, Chen R, Qian S, Meng G (2000) Characterization of L-asparaginase fused with a protective ScFv and the protection mechanism. Biochem Biophys Res Commun 276:197-203
- Hawkins DS, Park JR, Thomson BG, Felgenhauer JL, Holcenberg JS, Panosyan EH, Avramis VI (2004) Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. Clin Cancer Res 10:5335-5341
- Howard JB, Carpenter FH (1972) L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Substrate specificity and enzymatic properties. J Biol Chem 247:1020-1030
- Kiriyama Y, Kubota M, Takimoto T, Kitoh T, Tanizawa A, Akiyama Y, Mikawa H (1989) Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. Leukemia 3:294-297
- Kotzia GA, Labrou NE (2005) Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. J Biotechnol 119:309-323
- Krasotkina J, Borisova AA, Gervaziev YV, Sokolov NN (2004) One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Biotechnol Appl Biochem 39:215-221

- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee SM, Wroble MH, Ross JT (1989) L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. An improved recovery and purification process using affinity chromatography. *Appl Biochem Biotechnol* 22:1-11
- Lowther WT, Matthews BW (2000) Structure and function of the methionine aminopeptidases. *Biochim Biophys Acta* 1477:157-167.
- Moola ZB, Scawen MD, Atkinson T, Nicholls DJ (1994) *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochem J* 302:921-927
- Müller HJ, Boos J (1998) Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol* 28:97-113
- Oettgen HF, Old LJ, Boyse EA, Campbell HA, Philips FS, Clarkson BD, Tallal L, Leeper RD, Schwartz MK, Kim JH (1967) Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res* 27:2619-2631
- Oettgen HF, Stephenson PA, Schwartz MK, Leeper RD, Tallal L, Tan CC, Clarkson BD, Golbey RB, Krakoff IH, Karnofsky DA, Murphy ML, Burchenal JH (1970) Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Cancer* 25: 253-278
- Ortega JA, Nesbit ME Jr, Donaldson MH, Hittle RE, Weiner J, Karon M, Hammond D (1977) L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 37:535-540
- Richards NG, Kilberg MS (2006) Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu Review of Biochem* 75:629-654
- Schwartz JH, Reeves JH, Broome JD (1966) Two L-asparaginases from *E. coli* and their action against tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56:1516-1519
- Shokri A, Sandén AM, Larsson G (2003) Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:654-664

- Tong L, Lin Q, Wong WK, Ali A, Lim D, Sung WL, Hew CL, Yang DS (2000) Extracellular expression, purification, and characterization of a winter flounder antifreeze polypeptide from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 18:175-181
- Varshavsky A (2008) Discovery of cellular regulation by protein degradation. *J Biol Chem* 283:34469-34489.
- Walker JM (1996) SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: Human Press (ed) *The Protein Protocols Handbook*, Totowa, New Jersey, pp 57-61
- Wriston JC Jr, Yellin TO (1973) L-asparaginase: a review. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 39:185-248

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilidade comercial das asparaginases tem revolucionado a terapia molecular para a leucemia. Porém, ainda são observados muitos efeitos colaterais com a aplicação terapêutica de asparaginases bacterianas. Dessa maneira, tem-se lançado mão de numerosos estudos e modificações para melhorar os parâmetros farmacodinâmicos e a eficácia, como também para minimizar os efeitos colaterais observados no uso clínico da asparaginase. Deste modo, a caracterização das asparaginases recombinantes e o desenvolvimento de métodos de produção rápidos, simples e efetivos não são apenas de interesse acadêmico, como também de grande importância na prática clínica.

Este medicamento possui um amplo espectro de atividade antitumoral. Além da ALL, a enzima tem sido aplicada no tratamento de muitas outras doenças, como a doença de Hodgkin's, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, linfossarcoma, reticulossarcoma e melanossarcoma (Duval et al, 2002). No Brasil, as enzimas comercialmente disponíveis são obtidas a partir de culturas de *E. coli* (Crasnitin® e Elspar®, e Kidrolase®) e *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®), onde a produção de grandes quantidades de asparaginase é restrita pela baixa eficiência da técnica de fermentação.

No entanto, a asparaginase não é produzida no Brasil, o que resulta em um alto custo na importação deste medicamento. Em 2003, o país importou 10 diferentes tipos de medicamentos utilizados no manejo das neoplasias, gastando US\$ 9,8 milhões, sendo que cerca de US\$ 1,450 milhões foram gastos com a asparaginase (<http://www.ivfrj.ccsdecania.ufrj.br>). A fabricação da asparaginase no mercado nacional provocaria uma diminuição nas importações desse medicamento evitando que seu preço variasse conforme a oscilação do mercado internacional. Isso reduziria o seu preço, facilitando o acesso da população e do Sistema Único de Saúde (SUS) ao fármaco.

Esta é a primeira vez na literatura, até onde sabemos, que a seqüência que codifica a proteína madura de asparaginase de *E. carotovora* é clonada e expressa em *E. coli*. Outras pesquisas relatam a clonagem da seqüência de DNA que contém a seqüência peptídeo-sinal (Kotzia e Labrou, 2005; Krasotkina et al, 2004). O nosso objetivo foi comparar a expressão e a atividade de duas construções de asparaginase de *E. carotovora* (com e sem o peptídeo-sinal) para otimizar o processo de produção em larga escala. Como as asparaginases bacterianas são periplasmáticas, é esperado que o precursor deva conter uma seqüência peptídeo-sinal que direciona o seu transporte através da membrana periplasmática (Kotzia e



Labrou, 2005). Nossos resultados demonstraram que a proteína expressada a partir da construção de AspPS, com seqüência peptídeo-sinal já clivada pela célula, estava presente no periplasma, assim como no meio extracelular e com o peptídeo-sinal em níveis negligenciáveis no citoplasma (Figura 2 do manuscrito). As proteínas secretadas podem escapar do periplasma em direção ao meio de cultura, possivelmente devido à permeabilidade das membranas celulares. Proteínas pequenas secretadas para o espaço periplasmático são, freqüentemente, liberadas para o espaço extracelular (Tong et al, 2000), o que pôde ser observado com AspSP. Entretanto, este mecanismo de secreção de algumas proteínas superexpressas não é totalmente compreendido (Shokri, Sandén, Larsson, 2003).

Outra vantagem observada na utilização da construção de asparaginase sem a seqüência peptídeo-sinal é em relação ao protocolo de purificação, que utiliza um único passo de purificação, em contraste ao protocolo que utiliza duas etapas, utilizado para purificar a proteína AspSP. Além disso, o rendimento de AspMP foi de 80,1%, enquanto que AspSP apresentou um rendimento de 30,1%. Estas são características importantes que devem ser observadas objetivando a obtenção de uma produção da enzima em larga escala. Em relação à atividade específica, ambas as enzimas apresentaram valores de atividade amido-hidrolase semelhantes: 62,0 e 59,5 U mg<sup>-1</sup> para AspSP e AspMP, respectivamente.

O valor de  $K_m$  encontrado para o aminoácido asparagina foi cerca de 7 vezes mais alto para AspMP. Por outro lado, o valor de  $K_m$  e a constante de especificidade para o aminoácido glutamina para AspMP foi cerca de 2 vezes maior que AspSP, o que representa uma atividade de glutaminase menor para a proteína madura. Além disso, AspMP apresentou um valor de  $K_m$  para glutamina mais elevado quando comparado às asparaginases de *E. coli* (Derst, Henseling, Röhm, 2000) e de *E. chrysanthemi* (Moola et al, 1994), que foram 3,5 e 1,7 mM, respectivamente. Asparaginases com alta afinidade por asparagina e baixa afinidade por glutamina são preferíveis durante a série de terapia anticâncer (Hawkins et al, 2004), visto que a toxicidade da enzima asparaginase é parcialmente atribuída à atividade de glutaminase que ela pode apresentar (Howard e Carpenter, 1972).

Este trabalho apresenta um método eficiente e com alto rendimento para a obtenção de asparaginase recombinante de *E. carotovora*, com baixa atividade de glutaminase. O avanço científico tem permitido o emprego industrial de microorganismos ou células modificadas geneticamente objetivando a produção de proteínas de interesse em diversas áreas e, em especial, na saúde humana. A realização de experimentos de superexpressão (técnicas de DNA recombinante), purificação e caracterização da proteína asparaginase recombinante visam aperfeiçoar a produção desta em larga escala para futuramente suprir a demanda do

mercado nacional. Sendo assim, a realização deste projeto visa, futuramente, a produção nacional com tecnologia de ponta da enzima asparaginase recombinante. Este trabalho, eventualmente, poderá permitir a produção do fármaco no Brasil e pretende contribuir para a sensível redução de custos com importação e o fornecimento do fármaco a um número maior de pacientes que dele necessita para tratamentos de saúde.

## REFERÊNCIAS

AGHAIYPOUR, K.; WLODAWER, A.; LUBKOWSKI, J. Do bacterial L-asparaginases utilize a catalytic triad Thr-Tyr-Glu? **Biochimica et Biophysica Acta**; v. 1550, n. 2, p. 117-128, 2001.

AMYLON, M. D.; SHUSTER, J.; PULLEN, J.; BERARD, C.; LINK, M. P.; WHARAM, M.; KATZ, J.; YU, A.; LAVER, J.; RAVINDRANATH, Y.; KURTZBERG, J.; DESAI, S.; CAMITTA, B.; MURPHY, S. B. Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. **Leukemia**; v. 13, n. 3, p. 335-342, 1999.

ASSELIN, B.; WHITIN, J. C.; COPPOLA, D. J.; RUPP, I. P.; SALLAN, S. E.; COHEN, H. J. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. **Journal of Clinical Oncology**; v. 11, n. 9, p. 1780-1786, 1993.

AUNG, H. P.; BOCOLA, M.; SCHLEPER, S.; RÖHM, K. H. Dynamics of a mobile loop at the active site of *Escherichia coli* asparaginase. **Biochimica et Biophysica Acta**; v. 1481, n. 2, p. 349-359, 2000.

AVRAMIS, V. I.; PANOSYAN, E. H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. **Clinical Pharmacokinetics**; v. 44, n. 4, p. 367-393, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=344](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344)>. Acesso em 25 jun. 2007.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **The Journal of Experimental Medicine**; v. 118, n. 1, p. 99-120, 1963.

CHESELLS, J. M.; HALL, E.; PRENTICE, H. G.; DURRANT, J.; BAILEY, C. C.; RICHARDS, S. M. The impact of age on outcome in lymphoblastic leukaemia; MRC UKALL X and XA compared: a report from the MRC Pediatric and Adult Working Parties. **Leukemia**; v. 12, n. 4, p. 463-473, 1998.

CORTES, J. E.; KANTARJIAN, H. M. Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. **Cancer**; v. 76, n. 12, p. 2393-2417, 1995.

DERST, C.; HENSELING, J.; RÖHM, K. H. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase. II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. **Protein Sci**; v. 9, n. 10, p. 2009-2017, 2000.

DUVAL, M.; SUCIU, S.; FERSTER, A.; RIALLAND, X.; NELKEN, B.; LUTZ, P.; BENOIT, Y.; ROBERT, A.; MANEL, A. M.; VILMER, E.; OTTEN, J.; PHILIPPE, N. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**; v. 99, n. 8, p. 2734-2739, 2002.

GRAHAM, M. L. Pegaspargase: a review of clinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**; v. 55, n. 10, p. 1293-1302, 2003.

GUO, L.; WANG, J.; YAN, X.; CHEN, R.; OIAN, S.; MENG, G. Characterization of L-asparaginase fused with a protective ScFv and the protection mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**; v. 276, n. 1, p. 197-203, 2000.

HAWKINS, D. S.; PARK, J. R.; THOMSON, B. G.; FELGENHAUER, J. L.; HOLCENBERG, J. S.; PANOSYAN, E. H.; AVRAMIS, V. I. Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Cancer Research**; v. 10, n. 16, p. 5335-5341, 2004.

HOWARD, J. B.; CARPENTER F. H. L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Substrate specificity and enzymatic properties. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 247, n. 4, p. 1020-1030, 1972.

INSTITUTO VIRTUAL DE FÁRMACOS DO RIO DE JANEIRO. Sistema de Informação Sobre a Indústria Química. Disponível em:  
<[http://www.ivfrj.ccsdecania.ufrj.br/download/conf4\\_2005.ppt](http://www.ivfrj.ccsdecania.ufrj.br/download/conf4_2005.ppt)>. Acesso em 25 jun. 2007.

KIRIYAMA, M.; KUBOTA, M.; TAKIMOTO, T.; KITO, T.; TANIZAWA, A.; AKIYAMA, Y.; MIKAWA, H. Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. **Leukemia**; v. 3, n. 4, p. 294-297, 1989.

KOTZIA, G. A.; LABROU, N. E. Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. **J Biotechnol**; v. 119, n. 4, p. 309-323, 2005.

KOZAK, M.; JASKÓLSKI, M.; RÖHM, K. H. Preliminary crystallographic studies of Y25F mutant of periplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase. **Acta Biochimica Polonica**; v. 47, n. 3, p. 807-814, 2000.

KOZAK, M.; BOREK, D.; JANOWSKI, R.; KASKÓLSKI, M. Crystallization and preliminary crystallographic studies of five crystal forms of *Escherichia coli* L-asparaginase II (Asp90Glu mutant). **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**; v. 58, n. 1, p. 130-132, 2002.

KRASOTKINA, J.; BORISOVA, A. A.; GERVAZIEV, Y. V.; SOKOLOV, N. N. One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**; v. 39, n. 2, p. 215-221, 2004.

LAPORT, G. F.; LARSON, R. A. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. **Seminars in Oncology**; v. 24, n. 1, p. 70-82, 1997.

LOBEL, J. S.; O'BRIEN, R. T.; MCINTOSH, S.; ASPNES, G. T.; CAPIZZI, R. L. Methotrexate and asparaginase combination chemotherapy in refractory acute lymphoblastic leukemia of childhood. **Cancer**; v. 43, n. 3, p. 1089-1094, 1979.

MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase From *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**; v. 105, n. 2, p. 450-453, 1964.

MOOLA, Z. B.; SCAWEN, M. D.; ATKINSON, T.; NICHOLLS, D. J. *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. **Biochemical Journal**; v. 302, n. Pt 3, p. 921-927, 1994.

MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**; v. 28, n. 2, p. 97-113, 1998.

OETTGEN, H. F.; OLD, L. J.; BOYSE, E. A.; CAMPBELL, H. A.; PHILIPS, F. S.; CLARKSON, B. D.; TALLAL, L.; LEEPER, R. D.; SCHWARTZ, M. K.; KIM, J. H. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. **Cancer Research**; v. 27, n. 12, p. 2619-2631, 1967.

OETTGEN, H. F.; STEPHENSON, P. A.; SCHWARTZ, M. K.; LEEPER, R. D.; TALLAL, L.; TAN, C. C.; CLARKSON, B. D.; GOLBEY, R. B.; KRAKOFF, I.H.; KARNOFSKY, D. A.; MURPHY, M. L.; BURCHENAL, J. H. Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. **Cancer**; v. 25, n.2, p. 253-78, 1970.

OLLENSCHLÄGER, G.; ROTH, E.; LINKESCH, W.; JANSEN, S.; SIMMEL, A.; MÖDDER, B. 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. 512-516, 1988.

ORTEGA, J. A.; NESBIT, M. E. JR.; DONALDSON, M. H.; HITTLE, R. E.; WEINER, J.; KARON, M.;HAMMOND, D. L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia. **Cancer Research**; v. 37, n. 2, p. 535-540, 1977.

PARKER, S. L.; TONG, T.; BOLDEN, S.;WINGO, P. A. Cancer statistics, 1997. **CA: A Cancer Journal of Clinicians**; v. 47, n. 1, p. 5-27, 1997.

PUI, C.H.; EVANS, W.E. Acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**; v. 339, n.9, p. 605-615, 1998.

RCSB PDB Protein Data Bank. Disponível em:

<<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?job=graphics;pdbId=1hfw&opt=show&size=500>>. Acesso em 10 mar. 2007.

RICHARDS, N. G.; KILBERG, M. S. Asparagine synthetase chemotherapy. **Annual Review of Biochemistry**; v. 75, n. 1, p. 629-654, 2006.

SHOKRI, A.; SANDÉN, A. M.; LARSSON, G. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol**; n. 60, v. 6, p. 654-664, 2003.

SOBIN, L. H.; KIDD, J. G. Alterations in protein and nucleic acid metabolism of lymphoma 6C3HED-og cells in mice given guinea pig serum. **The Journal of Experimental Medicine**; n.123, p. 55-74, 1966.

TONG, L.; LIN, Q.; WONG, W. K.; ALI, A.; LIM, D.; SUNG, W. L.; HEW, C. L.; YANG, D. S. Extracellular expression, purification, and characterization of a winter flounder antifreeze polypeptide from *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif**; v. 18, n. 2, p. 175-181, 2000.

WRISTON, J. C. JR.; YELLIN, T. O. L-asparaginase: a review. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**; v. 39, p. 185-248, 1973.

## ANEXO I

### Testes de expressão da proteína asparaginase com e sem o peptídeo-sinal

#### Expressão de AspMP

A expressão da proteína madura de asparaginase recombinante, clonada sem o peptídeo-sinal no vetor de expressão pET30a(+), foi comparada utilizando-se diferentes cepas de *E. coli*, como BL21(DE3), C41(DE3) e Rosetta-gami(DE3). As diferentes cepas de *E. coli* foram transformadas, por eletroporação, com o plasmídeo recombinante pET30a(+) contendo o gene que codifica para a região madura da proteína asparaginase de *E. carotovora*. O mesmo procedimento foi realizado com o vetor pET30a(+), sem o gene de interesse clonado, para controle negativo de expressão.

As células transformadas foram selecionadas em meio LB sólido contendo os antibióticos apropriados para cada cepa de *E. coli* (Tabela I). Um pré-inóculo (OD<sub>600</sub> 1,0) a partir de uma colônia foi utilizado para inocular 50 mL de meio de cultura contendo os mesmos antibióticos e concentrações usadas no meio LB sólido e crescidas a 37°C sob agitação de 180 rpm até alcançarem uma OD<sub>600</sub> de 0,4. As culturas foram induzidas, ou não, com a adição de 1 mM de isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e incubadas a 37°C. Após 3, 6, 12, 18, 24 e 48 horas de incubação, 1 mL de cada cultura foi coletado. As amostras foram centrifugadas a 20.800 g, por 5 minutos a 4°C e estocadas a -20°C para posterior análise.

Tabela I. As cepas de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET30a(+) usadas na expressão da proteína asparaginase e os antibióticos apropriados para cada cepa com suas concentrações de uso.

Cepas de <i>E. coli</i> transformadas com o plasmídeo pET30a(+)*	Concentração de uso dos antibióticos
BL21(DE3)	30 µg/mL de kanamicina
C41(DE3)	30 µg/mL de kanamicina
Rosetta-gami(DE3)	34 µg/mL de Cloranfenicol, 30 µg/mL de kanamicina e 12,5 µg/mL de Tetraciclina

\*O plasmídeo pET30a(+) contém um gene para resistência à kanamicina.

A expressão da proteína foi avaliada por meio do rompimento das células por sonicação em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (5 mL de tampão para cada 1 g de célula). As células rompidas foram então centrifugadas a 20.800 x g durante 30 minutos, a 4°C e o conteúdo protéico das frações solúvel e insolúvel foi analisado em SDS-PAGE 12%.

A proteína foi expressa nas frações solúvel e insolúvel de todas as cepas testadas. Nas cepas C41(DE3) e Rosetta-gami(DE3), a proteína foi expressa com a indução de 1 mM de IPTG, enquanto que na cepa BL21(DE3) foi verificada a expressão da proteína com e sem indução.

Foram realizados outros testes de expressão com a cepa BL21(DE3) em meios LB e TB com outras temperaturas de cultivo, como 30 e 37°C, conforme descrito acima. Entretanto, com a diminuição da temperatura de cultivo, não há aumento da expressão da proteína.

### Expressão de AspSP

A expressão da proteína asparaginas recombinante, clonada contendo o peptídeo-sinal no vetor de expressão pET30a(+), foi comparada em diferentes cepas de *E. coli*, como BL21(DE3), C41(DE3) BL21(DE3)pLysS. Os testes de expressão foram realizados em meio LB, a 37 °C, conforme descrito na expressão de AspMP.

A expressão da proteína foi avaliada por meio do rompimento das células por sonicação em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (5 mL de tampão para cada 1 g de célula). As



células rompidas foram então centrifugadas a  $20.800 \times g$  durante 30 minutos, a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  e o conteúdo protéico das frações solúvel e insolúvel foi analisado em SDS-PAGE 12%.

A proteína foi expressa nas frações solúvel e insolúvel de todas as cepas testadas, com a indução de 1 mM de IPTG. Foi verificada a melhor expressão da proteína na cepa C41(DE3), após 6 horas de cultivo após a indução com IPTG.

## ANEXO II

### **Ensaio descontínuo de atividade de AspMP e AspSP**

Foi realizado o ensaio de atividade utilizando o reagente de Nessler para determinar a atividade qualitativa do extrato bruto de ambas as enzimas (AspSP e AspMP) nas cepas C41(DE3) e BL21(DE3). Neste ensaio, é analisada a capacidade da asparaginase de hidrolisar o aminoácido asparagina, convertendo-o em aspartato e amônia, onde se pode verificar a formação de uma coloração amarelo-alaranjada (Wriston e Yellin, 1973).

Um volume final de 1 mL contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, 20 mM de asparagina e 5 µg de enzima asparaginase foi incubado a 37 °C por 20 minutos. Um controle negativo foi realizado utilizando a mesma mistura, sem a adição da enzima. 125 µL de uma solução de ácido tricloroacético 15% foram adicionados às amostras, a fim de cessar a reação catalisada pela enzima. As amostras foram centrifugadas a 20.800 x g durante 3 minutos. Aos 150 µL do sobrenadante foram adicionados 775 µL de água e 75 µL do reagente de Nessler. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e pôde-se observar a formação de uma coloração amarelo-alaranjada em ambas as amostras.

## ANEXO III

### **Testes de purificação da proteína asparaginase clonada contendo o peptídeo-sinal**

Os testes de purificação foram realizados utilizando o sistema de purificação de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*HPLC*) ÄKTA (GE Healthcare) para o controle do fluxo, pressão da coluna cromatográfica, detecção de vários comprimentos de onda, pH, temperatura, controle de gradiente, aplicação e coleta de amostras. As células foram preparadas conforme descrito no manuscrito e, para a determinação do melhor protocolo de purificação, várias colunas cromatográficas foram utilizadas a fim de obter o melhor rendimento e a otimização do processo.

### **Teste de purificação no meio de cultivo**

Para o teste de purificação, células foram crescidas em 1 L de meio LB, conforme o teste de expressão no meio de cultivo citado no manuscrito. Após o crescimento de 6 horas com indução de 1 mM de IPTG, o meio de cultura foi centrifugado a 20.000 rpm, a 4°C, por 15 min. O sobrenadante foi concentrado até 10 mL em Amicon Bioseparations (Millipore), dialisado contra o tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 e aplicado na coluna. Foram utilizadas as colunas cromatográficas de troca catiônica HiTrap SP XL e HiTrap SP FF, utilizando o tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 como tampão de corrida e fosfato de sódio 50 mM + NaCl 1 M, pH7,5 para realizar o gradiente de 0 a 100% a fim de eluir a proteína.

Em ambas as colunas testadas, a proteína não interagiu com a resina da coluna, pois a mesma foi observada em todos os lavados e nunca no gradiente.

### **Testes de purificação no citoplasma**

Para os testes de purificação, as células de AspSP foram crescidas e tratadas conforme descrito no manuscrito. Foram utilizadas colunas cromatográficas de troca catiônica (como a HiTrap SP XL, HiTrap SP FF, HiTrap CM FF e Mono S) e de gel filtração (Sephacryl S200). Os tampões testados foram fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 e fosfato de potássio 20 mM pH 5,5 utilizando como gradiente fosfato de sódio 50 mM + KCl 1 M, pH 7,0 e fosfato de potássio 20 mM + KCl 1 M, pH 5,5, respectivamente. Houve interação da proteína de interesse apenas na segunda condição testada, onde a proteína foi eluída com 38% do gradiente e não foi totalmente separada das outras proteínas presentes na amostra.

Também foi testada a purificação da enzima utilizando um gradiente de pH, conforme descrito no manuscrito. Além deste, foi realizado o mesmo teste, porém utilizando como gradiente o tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,5 e, após este, foi adicionado o tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 8,5. Houve interação da proteína alvo com a resina em ambos os testes, onde a purificação mais eficiente foi observada na mesma relatada no manuscrito.

Após a amostra contendo a proteína alvo ser eluída da coluna HiPrep SP XL, utilizando o gradiente de pH descrito no manuscrito, foi testada uma segunda coluna, a Sephacryl S200 e uma terceira, a Mono S, na tentativa de separar algumas proteínas contaminantes visíveis quando as frações eluídas foram agrupadas e concentradas. Não havendo diferença do resultado com a adição de qualquer dessas colunas, optou-se, como protocolo final de purificação, utilizar apenas a coluna de gel filtração Sephacryl S200, conforme descrito no manuscrito.

**ANEXO IV****Documento de confirmação de submissão do manuscrito**

**From:** onbehalf@scholarone.com on behalf of AMBoffice@gmx.de  
**Sent:** Tue 2/17/2009 8:58 PM  
**To:** Luiz Augusto Basso  
**Subject:** Applied Microbiology and Biotechnology - Manuscript ID AMB-09-17756

17-Feb-2009

Dear Dr. Basso:

Your manuscript entitled "Comparison between two *Erwinia carotovora* L-Asparaginase II constructions: cloning, heterologous expression, purification, and kinetic characterization" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in "Applied Microbiology and Biotechnology".

Your manuscript ID is AMB-09-17756.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your postal address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/amb> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/amb> .

Thank you for submitting your manuscript to "Applied Microbiology and Biotechnology".

Sincerely,  
Applied Microbiology and Biotechnology Editorial Office