



**Clonagem e Expressão da Enzima
L-asparaginase de *Zymomonas mobilis*
em *Pichia pastoris***

Juliana Christina Castanheira Vicente Pereira

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Prof. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, DSc

Prof. Rodrigo Volcan Almeida, DSc

Karen Einsfeldt, DSc

Gabriela Coelho Brêda

Agosto de 2015

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA
L-ASPARAGINASE DE *Zymomonas mobilis* EM *Pichia
pastoris***

Juliana Christina Castanheira Vicente Pereira

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química,
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de engenheira
química.

Aprovado por:

Ivaldo Itabaiana Junior, DSc

Mateus Gomes de Godoy, DSc

Wagner Lopes, DSc

Orientado por:

Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, DSc

Rodrigo Volcan Almeida, DSc

Karen Einsfeldt, DSc

Gabriela Coelho Brêda

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Agosto de 2015

Pereira, Juliana Christina Castanheira Vicente.

Clonagem e expressão da enzima L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *Pichia pastoris* / Juliana Christina Castanheira Vicente Pereira. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2015.

viii, 43 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2015.

Orientadores: Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, Rodrigo Volcan Almeida, Karen Einsfeldt e Gabriela Coelho Brêda.

1. L-asparaginase. 2. Expressão de enzima recombinante. 3. *Zymomonas mobilis*. 4. *Pichia pastoris*. 5. Monografia. (Graduação – EQ/UFRJ). 6. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra *et al.* I. Título

Dedico este trabalho aos meus pais, Miriam e Carlos Alberto.
Tudo que conquistei na vida é graças a vocês dois.

“If you have no voice, scream.

If you have no legs, run.

If you have no hope, invent.”

– *Cirque du Soleil*

“Mas na profissão, além de amar tem de saber.

E o saber leva tempo pra crescer.”

– *Rubem Alves*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, minha fortaleza, que me guiou e abençoou, iluminando meu caminho ao longo de toda essa jornada.

Aos meus pais, Miriam e Carlos Alberto, por todo o carinho, paciência, compreensão, apoio, ajuda, por não me deixarem cair na tentação de acreditar que não conseguiria, por todos os planos desmarcados, champignons cortados no bisturi, idas ao Fundão depois das 21h, por amarem incondicionalmente essa filha enrolada e metida a querer ser tudo e fazer tudo ao mesmo tempo.

Aos dindinhos Marcos, Denise e Elen, ao tio Zé (*in memoriam*), tio Geninho, tia Malu, tio Jorge (*in memoriam*) e tia Valerinha, os primos Zenrique, André, Carla e Paulinha, e toda a minha família, pelo apoio e confiança.

Aos meus orientadores e ex-orientadores, Melissa, Volcan, Gabi, Karen, Lívia e Andrea, por me ensinarem, ajudarem e me servirem de inspiração.

Ao meu namorado, Erick, por me amar, compreender, me fazer rir e me ouvir a ponto de já estar (quase) sabendo sobre asparaginases, minipreps, autoclaves e eppendorfs.

Aos amigos queridos da Escola de Química, em especial, Flores, Conrado, Arthur, Gustavo, Liciane, Lucas Grillo, Vitor, Biro, Lucas Calado, Matheus, Diogo, Otto, Vanessas, Rodrigo, Magalhães, Felipe Di Napoli, Erica, Gabi, Diego, Rafa, Rita e Rafael Oliveira. Sem vocês eu não sobreviveria à EQ.

Aos outros amigos da UFRJ, de modo especial, Aloizio, Daphne, Sanderson, Marcos, Antonios, Soneca, Pier, Danilo, Ivan e Nina, pelos almoços, conselhos e risadas, por fazer dessa ilha um lugar mais doce.

À Érica e à Brunna, por uma amizade que vai além do tempo.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório Vê, Carin, Paula, Isis, Mari, Giulia 1 e 2, Le, Marcelo, Rosane, Sheila e Wilber, pela ajuda e amizade.

Aos professores de “bichão”, Maria Antonieta, Priscilla, Élcio, Juliana e Roberta, por toda a confiança depositada.

Aos professores de teatro e dança, por me ensinarem a confiar em mim.

E ao Major Paulo Maria Pereira, professor de física do 3º ano, por, mesmo não percebendo, ter-me questionado acerca das minhas decisões, de forma que eu já tivesse uma resposta em muitas das vezes em que desanimei.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de engenheira química.

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE DE *Zymomonas mobilis* EM *Pichia pastoris*

Juliana Christina Castanheira Vicente Pereira

Agosto, 2015

Orientadores: Prof. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, DSc
Prof. Rodrigo Volcan Almeida, DSc
Karen Einsfeldt, DSc
Gabriela Coelho Brêda

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é um tipo de câncer que afeta a medula óssea, e cujo principal tratamento é o uso terapêutico da enzima L-asparaginase. Grande parte dos pacientes tratados apresenta resposta imune às enzimas disponíveis para essa finalidade, que são provenientes de *Escherichia coli* ou *Erwinia chrysantemi*. A L-asparaginase de *Zymomonas mobilis*, expressada tanto de forma nativa quanto por *E. coli* recombinante, foi estudada pelo Laboratório de Bioprocessos da COPPE-UFRJ, apresentando atividade antileucêmica. O presente trabalho visou promover a produção da L-asparaginase da bactéria *Z. mobilis* através da clonagem e expressão constitutiva na levedura *Pichia pastoris*. Para concluir as etapas de clonagem, o plasmídeo pGAPZαB contendo o gene L-asparaginase sob controle do promotor da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi inserido em *E. coli* JM109 para estoque, sendo posteriormente transformado em *P. pastoris* X33. Os organismos transformantes de levedura obtidos foram submetidos a seleção em placas de Petri contendo meio de cultivo sólido com Zeocina. Foram realizados então cultivos dos clones selecionados em frascos agitados contendo meio de expressão, em batelada simples e, posteriormente, realizando alimentação com glicerol, observando-se, ao longo dos cultivos, o comportamento do crescimento celular, o consumo de glicerol e atividade da enzima L-asparaginase no sobrenadante do meio de cultivo. Também foi avaliada a possibilidade da retenção da enzima no periplasma celular, por dosagem da atividade utilizando as células íntegras. Foram obtidos 17 clones, dos quais 2 apresentaram resistência a 1000 µg/mL de Zeocina. Os resultados indicaram, em batelada simples, atividades por grama de células iguais a 0,4 e 0,6 UI/g. Não foi detectada atividade enzimática no cultivo em batelada alimentada. A análise das células íntegras também não detectou a retenção da enzima no periplasma celular.

SUMÁRIO

Capítulo I – Introdução	1
<i>I.1 – A enzima L-asparaginase e sua utilização para fins terapêuticos</i>	1
I.1.1–Variantes da enzima disponíveis para fins terapêuticos	3
I.1.2 – A L-asparaginase de <i>Zymomonas mobilis</i>	5
<i>I.2 – Produção de enzimas recombinantes por microrganismos para fins terapêuticos</i>	6
I.2.1 – A levedura <i>Pichia pastoris</i> como plataforma de expressão	7
Capítulo II – Objetivos	11
<i>II.1 – Objetivos específicos</i>	11
Capítulo III – Materiais e Métodos	12
<i>III.1 – Plasmídeo utilizado</i>	12
<i>III.2 – Microrganismos utilizados</i>	13
<i>III.3 – Preparo de células competentes e transformação em E. coli</i>	13
<i>III.4 – Extração plasmidial</i>	14
<i>III.5 – Confirmação da clonagem em E. coli</i>	16
<i>III.6 – Preparo de células competentes e transformação em P. pastoris</i>	16
III.6.1 – Linearização plasmidial	16
III.6.2 – Preparação de <i>P. pastoris</i> competente	17
III.6.3 – Transformação em <i>P. pastoris</i>	18
<i>III.7 – Seleção dos transformantes</i>	18
<i>III.8 – Curva de massa seca</i>	19
<i>III.9 – Curva de crescimento em meio BMGY</i>	20
<i>III.10 – Dosagem do glicerol no meio de cultivo</i>	20
<i>III.11 – Expressão em frascos agitados</i>	21
<i>III.12 – Dosagem de proteínas totais</i>	21
<i>III.13 – Eletroforese em gel de poliacrilamida</i>	22
<i>III.14 – Dosagem de atividade enzimática</i>	22
III.14.1 – Extracelular.....	22
III.14.2 – Utilizando as células íntegras	24
<i>III.15 – Expressão em frascos agitados com alimentação</i>	25
Capítulo IV – Resultados e Discussão	26
<i>IV.1 – Transformação em E. coli</i>	26
<i>IV.2 – Transformação em P. pastoris</i>	27
<i>IV.3 – Seleção dos transformantes</i>	28
<i>IV.4 – Ensaio com os transformantes selecionados</i>	29
IV.4.1 – Curvas de crescimento	29

IV.4.2 – Análise da expressão da enzima L-asparaginase	31
IV.4.3 – Análise do consumo de glicerol ao longo do tempo	34
IV.4.4 – Cultivo em batelada com alimentação de glicerol.....	35
IV.4.5 – Medida da atividade utilizando as células íntegras.....	37
Capítulo V – Conclusões	38
Capítulo VI – Perspectivas Futuras	39
Capítulo VII – Referências Bibliográficas	40

Capítulo I – Introdução

I.1 – A enzima L-asparaginase e sua utilização para fins terapêuticos

A leucemia é um dos dez tipos de câncer mais frequentes no Brasil, sendo a leucemia linfoblástica aguda (LLA) o tipo mais comum na infância e adolescência na maioria das populações (cerca de 25 a 35%), embora também venha a afetar adultos (INCA, 2014). A LLA, uma doença altamente heterogênea, é caracterizada pela expansão clonal dos blastos (células sanguíneas jovens) hematopoéticos, tomando o lugar das células sanguíneas saudáveis (FADERL *et al.*, 2010).

Os principais sintomas relacionados à doença incluem febre, sudorese noturna, perda de peso, feridas ou sangramentos, dificuldade de respiração, vertigens e infecções. Também é possível o aparecimento de dores nas articulações e, em menores incidências, envolvimento sintomático do sistema nervoso central (FADERL *et al.*, 2010).

Nesse contexto, a L-asparaginase, uma enzima de elevada importância quimioterapêutica, tem sido amplamente utilizada, com sucesso, no tratamento de uma variedade de transtornos linfoproliferativos e linfomas; de modo especial, a LLA. A enzima tem mostrado alta eficiência na indução e nas etapas subsequentes de diversas estratégias de quimioterapia (NARTA *et al.*, 2007, NARTA *et al.*, 2011).

O histórico do uso terapêutico da enzima começou quando KIDD (1953) constatou que a administração intraperitonal do soro de porquinho-da-índia (espécie não identificada pelo autor) em ratos levava à regressão de alguns tipos de linfossarcomas subcutâneos, efeito que não foi percebido ao se utilizar o soro de cavalos ou coelhos. No entanto, foi BROOME (1961) quem propôs a relação das propriedades terapêuticas do soro à alta concentração da enzima L-asparaginase no mesmo (CLEMENTI, 1922). Desde então, inúmeros estudos acerca da enzima e sua atuação foram realizados, de forma a ser descoberto, alguns anos depois, que a L-asparaginase isolada de *Escherichia coli* (*E. coli*) também apresentava atividade antitumoral semelhante à encontrada no soro

do porquinho-da-índia (KURZBERG, 2000; CAMPBELL e MASHBURN,1969; MASHBURN e WRISTON, 1964).

A L-asparaginase catalisa a hidrólise do aminoácido L-asparagina a ácido aspártico e amônio (figura 1), o que resulta em uma queda na concentração da L-asparagina no meio. A importância terapêutica dessa atuação se dá pelo fato de linfoblastos leucêmicos e alguns outros tipos de células tumorais possuírem níveis de L-asparagina sintetase muito baixos ou inexistentes, o que leva essas células a dependerem da corrente sanguínea como única fonte de suprimento desse aminoácido. Desta forma, a depleção da asparagina pela atuação da L-asparaginase leva as células doentes à morte pela privação de um fator essencial para a síntese protéica. As células saudáveis, por sua vez, possuem níveis da asparagina-sintetase suficientes para repor a asparagina consumida na reação catalisada pela L-asparaginase (KURZBERG, 2000; NARTA *et al.*, 2007).

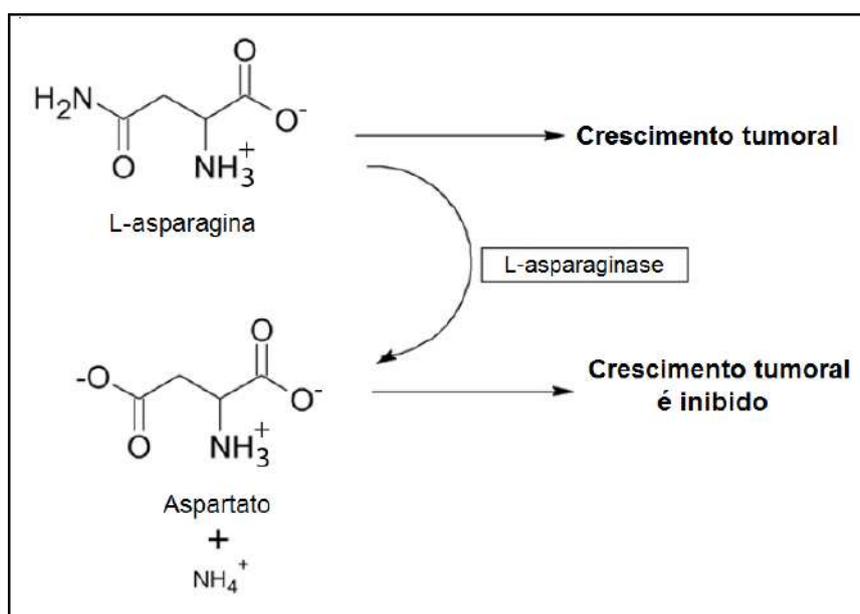


Figura 1 – Mecanismo de atuação da L-asparaginase e seu efeito terapêutico no tratamento da LLA (adaptado de NARTA *et al.*, 2007).

A bactéria *Escherichia coli* possui dois tipos da enzima L-asparaginase, classificadas como tipo I (citossólica) e tipo II (periplasmática). A enzima tipo I possui elevado Km em relação à tipo II, de forma que somente a segunda tenha apresentado atividade antitumoral. A estrutura da L-asparaginase tipo II é de um homotetrâmero composto de quatro sub-unidades idênticas em sua

forma ativa, denominadas A, B, C e D (figura 2 (a)), possuindo uma massa total que varia de 138 a 150kDa (KOZAK *et al.*, 2000; KURZBERG, 2000, AGHAIYPOUR *et al.*, 2001). O seu sítio ativo (sequência Thr12, Tyr25, Ser58, Thr89, Asp90, Lys162, Asn248 e Glu283 da enzima tipo II de *E. coli*) é criado pelas sub-unidades adjacentes A e C ou B e D, e pode ter seu local definido pela localização do produto reacional, L-aspartato, na estrutura cristalográfica da enzima (KOZAK *et al.*, 2000; KOZAK *et al.*, 2002), conforme mostrado na figura 2 (b).

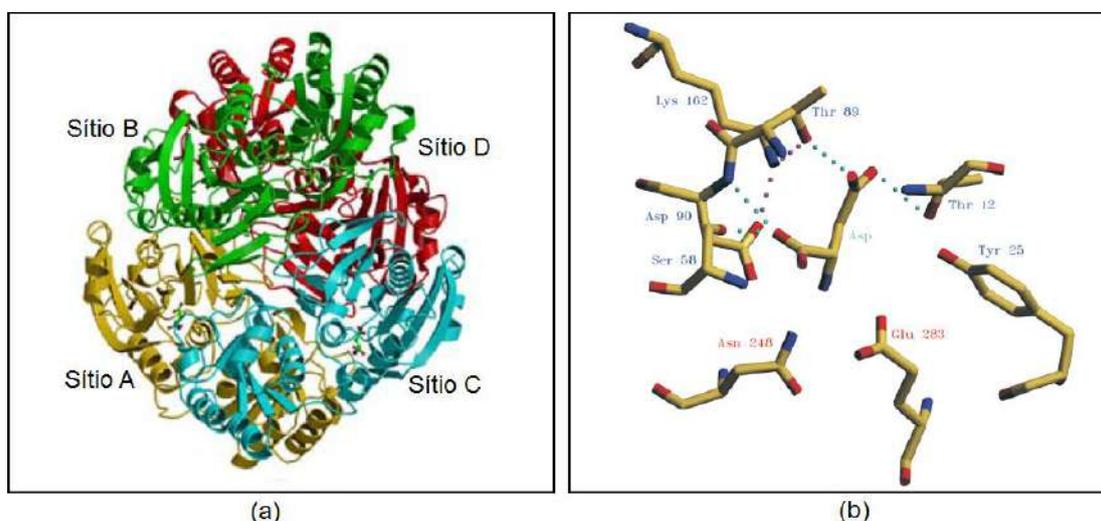


Figura 2 – (a) Estrutura tetramérica da enzima L-asparaginase tipo II de *Escherichia coli* complexada com a L-asparagina, evidenciando as quatro sub-unidades que compõem a estrutura quaternária da proteína (adaptado de YUN *et al.*, 2007); (b) sítio ativo da L-asparaginase tipo II de *E. coli* (SWAIN *et al.*, 1993).

I.1.1–Variantes da enzima disponíveis para fins terapêuticos

Existem três tipos de asparaginases que vêm sendo utilizados até hoje: a enzima nativa derivada de *E. coli* (*Escherichia coli* asparaginase, produzida sob cinco diferentes nomes comerciais), uma forma conjugada ao polietilenoglicol da enzima de *E. coli* e a enzima isolada de *Erwinia chrysantemi* (*Erwinia* asparaginase). Entretanto, algumas das preparações citadas não são disponíveis em todos os países (PIETERS *et al.*, 2011). A asparaginase de *E. chrysantemi*, por exemplo, só é permitida no Canadá e em alguns países da Europa, para pacientes que apresentam reação do sistema imunológico à enzima de *E. coli* (KURZBERG, 2000).

Outras formas da enzima que vêm sendo estudadas são a produção de L-asparaginase recombinante idêntica à Asparaginase Medac de *E. coli*, que está sob avaliação clínica, e uma forma associada ao polietilenoglicol da enzima de *E. chrysantemi* (PIETERS *et al.*, 2011).

No Brasil, só é permitido o uso terapêutico da L-asparaginase de *Escherichia coli*, e todo o medicamento utilizado é obtido por importação, seja da enzima purificada ou de medicamentos contendo a enzima. As quantidades de L-asparaginase importadas por ano são irregulares e não obedecem um padrão, o que indica que a importação é dependente da demanda (EINSFELDT, 2014; MDIC, 2015). Até o ano de 2013, a enzima era importada pelos serviços de oncologia do Sistema Único de Saúde (SUS). No entanto, com a interrupção do medicamento pela empresa Merck & Co., sob o nome comercial *Elspar*[®], que o fornecia para a distribuidora brasileira, o Ministério da Saúde assumiu a compra da L-asparaginase, além de ter permitido a aquisição centralizada por meio de novo fornecedor (FIOCRUZ, 2014). Além disso, o ministério também garantiu que, a partir do ano de 2015, a L-asparaginase seria produzida no Brasil, em uma parceria entre a Fiocruz e os laboratórios privados *NT Pharma* e *Unitec Biotec* (FIOCRUZ, 2013).

O grande problema associado ao uso terapêutico da enzima L-asparaginase reside no fato de o tratamento apresentar elevada taxa de imunogenicidade, que pode variar de efeitos como urticária, febre, náuseas, dores de cabeça e calafrios a efeitos mais graves, como disfunção hepática, azotemia e, em casos extremos, a disfunções cerebrais, anafilaxia e morte (OHNUMA *et al.*, 1970; NARTA *et al.*, 2007).

Portanto, buscam-se formas alternativas do tratamento com L-asparaginase que tenham efeito imunogênico reduzido. Uma delas é a combinação da asparaginase a outros agentes quimioterápicos, como corticoesteróides, alcalóides, antibióticos, dentre outros, evitando as reações alérgicas (NARTA *et al.*, 2007; BAPTISTA, 2013).

Outra alternativa, conforme já exposto, é o uso da enzima isolada de *E. chrysantemi*, que, embora ainda não tenha sido amplamente estudada, tem se mostrado menos imunogênica, visto que apresenta níveis de indução a anormalidades de coagulação inferiores àquela proveniente de *E. coli* (DUVAL *et al.*, 2002; PIETERS *et al.*, 2011). Contudo, foi constatado também que a

eficiência clínica da enzima de *E. chrysantemi* é inferior à de *E. coli*, na aplicação de dosagens iguais das duas enzimas a longo prazo, o que demanda a adaptação na administração da dosagem ao utilizar a enzima de *E. chrysantemi* (DUVAL *et al.*, 2002).

Uma terceira proposta para diminuição dos efeitos imunogênicos da L-asparaginase que tem apresentado resultados positivos é a conjugação da enzima ao polietilenoglicol (PEG-L-asparaginase) (KURZBERG, 2000; NARTA *et al.*, 2007). De modo geral, as cadeias do polímero associado à enzima formam uma barreira alostérica à interação de moléculas grandes, como anticorpos e enzimas proteolíticas, bloqueando sítios imunogênicos de forma a não ser reconhecida pelo sistema imunológico, sem que com isso prejudique a associação de moléculas pequenas, como a L-asparagina, à enzima (PASUT e VERONESE, 2009). A aplicação da PEG-L-asparaginase como agente terapêutico foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1994 para uso em quimioterapia combinada para tratamento de pacientes com LLA que apresentaram hipersensibilidade às formas nativas de L-asparaginase (PASUT e VERONESE, 2009; KURZBERG, 2000). Nos Estados Unidos, a enzima associada ao PEG pode ser usada em primeiro caso (VAN DER BERG, 2011).

I.1.2 – A L-asparaginase de *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis (*Z. mobilis*) é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, encontrada na forma de bastonete, que foi isolada da cidra pela primeira vez em 1911 por Baker e Hillier (ABUD, 2005). A bactéria é conhecida pela sua capacidade de produzir etanol de forma rápida e eficiente ao utilizar açúcares simples como únicas fonte de carbono, e de catabolizar substratos com altas taxas específicas, obtendo baixos rendimentos de biomassa, visto que parte do carbono utilizado é convertido em etanol (DOELLE *et al.*; 1993, TOMA *et al.*, 2003).

É constatado na literatura que o caldo fermentativo de *Z. mobilis* possui ação terapêutica contra aftose e doença de Bang em gado bovino, bem como contra distúrbios intestinais e ginecológicos em seres humanos, que por muitas

vezes se caracterizam por respostas de resistência a medicamentos quimioterápicos e antibióticos (ABUD, 2005).

Foi estudado o potencial da enzima L-asparaginase produzida por *Z. mobilis* para fins terapêuticos, muito embora tenha se constatado que a produtividade da enzima pela cepa é muito baixa (CALAZANS, 1997; PINHEIRO, 2001). ABUD (2005) realizou estudos a fim de determinar as melhores condições para expressão nativa da enzima de *Z. mobilis*, e EINSFELDT (2014) obteve altas expressões ao utilizar a enzima de *Z. mobilis* em *E. coli* recombinante, usando mecanismo de indução por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e por lactose. A enzima recombinante apresentou atividade antitumoral ao ser testada em células doentes isoladas de pacientes com LLA, observando-se um percentual de células mortas superior a 80% ao usar a enzima na dose de 1,0 UI/mL, o que pode ser considerado um efeito significativo em comparação ao grupo controle (células que não receberam tratamento), que apresentou 30% de morte celular (BAPTISTA, 2013).

I.2 – Produção de enzimas recombinantes por microrganismos para fins terapêuticos

Devido à rápida expansão da indústria biotecnológica nos últimos anos, a expressão de diversas proteínas recombinantes em diferentes sistemas de expressão tem se tornado, ao mesmo tempo, um dever e um desafio (ANDERSEN e KRUMMEN, 2002).

Nesse contexto, dentre os principais hospedeiros utilizados para expressão de proteínas recombinantes, de uso terapêutico ou não, o mais utilizado é a bactéria *Escherichia coli*, visto que o microrganismo oferece vantagens como produção rápida e econômica. Desta forma, é possível encontrar na literatura rotas econômicas de produção de proteínas terapêuticas, como insulina e hormônio de crescimento bovino utilizando esta bactéria como plataforma de expressão (ANDERSEN e KRUMMEN; 2002, JANA e DEB, 2005).

No entanto, a vasta aplicação desse sistema apresenta dificuldades. Uma delas é a tentativa de produzir proteínas derivadas de eucariotos, que podem resultar em enovelamento inadequado ou ausência de modificações

pós-traducionais, inexistentes em bactérias e essenciais para o funcionamento correto de determinadas proteínas, tais quais glicosilação, isomerização cis/trans de resíduos de prolina, isomerização de dissulfeto, lipidação, sulfatação ou fosforilação (DULY e HEARN, 2005). Outra dificuldade encontrada é o fato de serem complexos os mecanismos de incorporação do fragmento de DNA exógeno ao genoma da *E. coli*, utilizando-se, em grande parte das vezes, plasmídeos que se mantêm íntegros, sendo assim necessário um constante monitoramento dos cultivos a fim de se verificar que não houve perda plasmidial durante a divisão celular (GUPTA et al., 1995), o que pode afetar drasticamente a expressão do produto de interesse (FRIEHS, 2004). É interessante, portanto, o estudo da utilização de outros organismos como hospedeiros, como as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) e *Pichia pastoris* (*P. pastoris*), que são as mais utilizadas para tais finalidades (ANDERSEN e KRUMMEN, 2002).

I.2.1 – A levedura *Pichia pastoris* como plataforma de expressão

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica que pode ser modificada geneticamente para expressar proteínas, para fins tanto de pesquisa quanto industriais (CEREGHINO et al., 2002).

Dentre as vantagens oferecidas pela levedura em comparação a outros sistemas de expressão, destacam-se uma elevada taxa de crescimento celular e a possibilidade de cultivo em alta densidade celular, alta produtividade em meios de cultivo com baixos níveis de proteína, facilidade de manipulação genética, ausência de riscos conhecidos à saúde humana, tanto por parte da levedura quanto dos vírus que conhecidamente podem usar a mesma como hospedeira, a capacidade de realizar modificações pós-traducionais, possuindo um padrão de glicosilação mais baixo e mais vantajoso que o de *S. cerevisiae*, o fato de a levedura preferir uma rota metabólica respiratória em vez de uma fermentativa anaeróbica – o que evita os danos causados pelo excesso de produtos resultantes de fermentação, como etanol e ácido acético, que podem ser tóxicos para o cultivo em alta densidade celular – e a alta afinidade da levedura a fontes de carbono de baixo custo, como o glicerol (CEREGHINO et

al., 2002, ÇELIK e ÇALIK; 2012, LI *et al.*, 2007, MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

A maior parte dos promotores utilizados em *P. pastoris* que atuam sob regulação deriva de genes que codificam rotas de utilização do metanol, que são geralmente reprimidas por glicose ou etanol e fortemente induzidos pela presença de metanol (PRIELHOFER *et al.*, 2013). Destaca-se a utilização do pAOX, um promotor derivado da enzima álcool oxidase 1 (AOX1), conhecido por ser um dos promotores eucarióticos mais estritamente regulados, sendo fortemente induzido na presença de metanol (ÇELIK e ÇALIK, 2012).

Contudo, também é conhecida a utilização de promotores constitutivos, que podem ser vantajosos para super-expressão de genes ou para co-expressão de cofatores ou de genes de marcação. Destaca-se, nesse contexto, o promotor da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *P. pastoris* (pGAP), uma enzima-chave na via glicolítica, cuja produtividade é influenciada pelo controle da taxa de crescimento celular e pelos níveis de oxigênio disponível no meio. O pGAP possui fortes níveis de expressão constitutiva, comparáveis às obtidas utilizando o promotor pAOX (QIN *et al.*, 2011, PRIELHOFER *et al.*, 2013). Um típico processo de expressão utilizando o pGAP usa glicerol em uma etapa de batelada simples, e uma alimentação constante de glicose por 100 horas, podendo atingir uma densidade celular superior a 100 g/L (COS *et al.*, 2006; PRIELHOFER *et al.*, 2013).

A grande vantagem do uso do pGAP em relação ao pAOX é o fato de o primeiro não necessitar da indução utilizando metanol. Este fato permite um crescimento mais direcionado da cepa hospedeira, sem a necessidade da etapa de mudança da fonte de carbono no processo, além de eliminar os danos e custos relacionados ao estoque e transporte de grandes volumes de metanol (QIN *et al.*, 2011).

É possível encontrar na literatura a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* com segregação para o meio extracelular. Embora diversas sequências, inclusive aquelas encontradas na levedura de forma nativa, tenham sido utilizadas com sucesso para este fim, a que apresentou melhores resultados foi a sequência S5 de aminoácidos do peptídeo-sinal MAT α de *S. cerevisiae*, sendo uma das mais frequentemente incorporadas em vetores de expressão para *P. pastoris* (CEREGHINO *et al.*, 2002).

Uma das formas mais utilizadas para aumentar a expressão em *P. pastoris* é o aumento do número de cópias incorporadas ao genoma (BRIERLEY, 1998; THILL *et al.*, 1990). Para essa finalidade, existem duas formas de abordagem conhecidas: uma se volta à construção de um vetor que tenha sua região de expressão uma sequência flanqueada por sítios de restrição de extremidades complementares. Dessa forma, a repetição das etapas de clivagem e reinserção acaba por levar a inúmeras repetições da sequência de expressão no vetor (conforme exemplificado na figura 3). A outra abordagem utiliza vetores de expressão que contêm sequências de resistência a antibióticos específicos como marcadores seletivos, como os genes bacterianos *Kan^R*, *Zeo^R* e *Bsd^R*, que conferem resistência aos antibióticos Canamicina, Zeocina e Blastidina, respectivamente, e realiza a seleção das cepas utilizando como critério a maior resistência ao antibiótico, visto que, uma vez que cada cópia do gene oferece significativa capacidade de resistência, a sobrevivência da cepa a maiores concentrações do antibiótico seletivo indica a presença de um maior número de cópias (figura 4), o que afetará os níveis de expressão da enzima de interesse (BRIERLEY, 1998; CREGG *et al.*, 2009; DALY e HEARN, 2005).

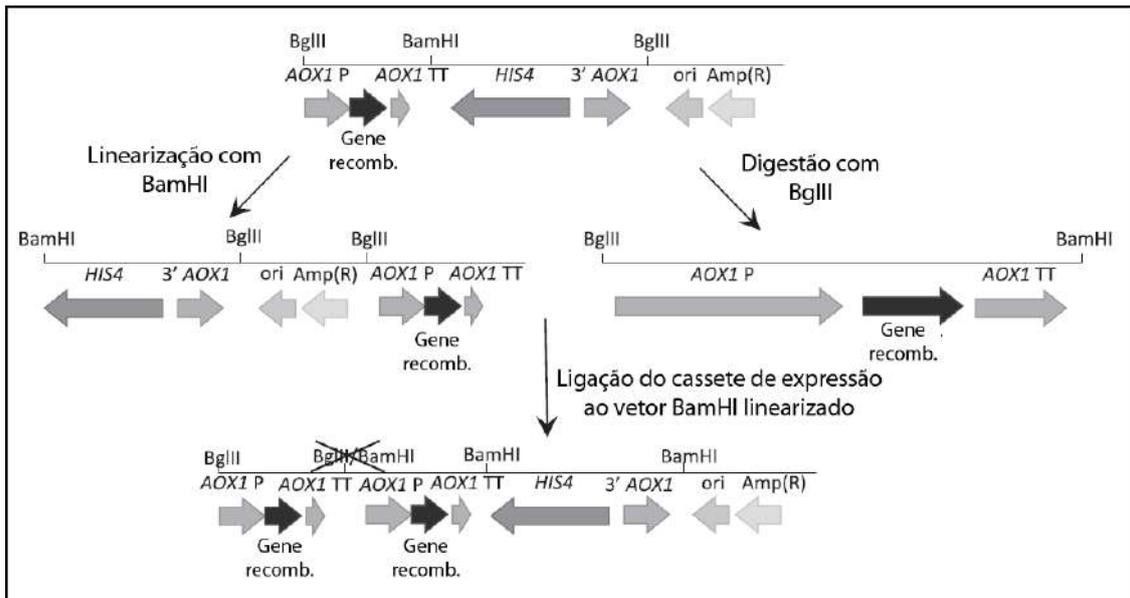


Figura 3 – Exemplo de procedimento de inserção de múltiplas cópias do gene através da construção de um vetor que contenha inúmeras cópias do cassete de expressão, por meio da repetição de procedimentos de clivagem do cassete de expressão por digestão com a enzima de restrição BamHI, linearização do plasmídeo utilizando a enzima BglIII e ligação dos dois fragmentos obtidos (adaptado de AW e POLIZZI, 2013).

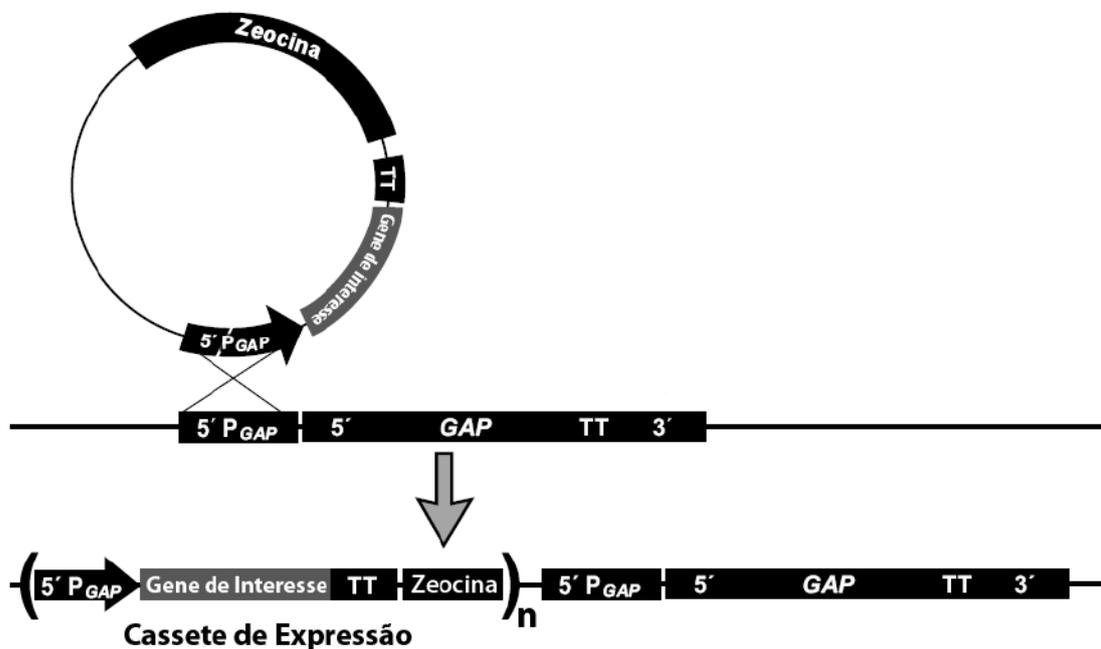


Figura 4 – Exemplo de integração do plasmídeo ao genoma do organismo hospedeiro, que pode ocorrer inúmeras vezes. Visto que o cassete de expressão que é inserido contém o gene de resistência ao antibiótico Zeocina, quanto maior o número de cópias, maior a concentração do antibiótico à qual o organismo se torna resistente (INVITROGEN, 2002, adaptado).

Capítulo II – Objetivos

Tendo em vista os dados apresentados, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma nova L-asparaginase através da clonagem do gene de *Zymomonas mobilis* na levedura *Pichia pastoris*.

II.1 – Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- A obtenção de transformantes contendo um elevado número de cópias do gene de L-asparaginase de *Z. mobilis* inserido incorporadas ao genoma, através de seleção por resistência ao antibiótico Zeocina;
- A expressão da enzima L-asparaginase pela levedura *Pichia pastoris* em frascos agitados;
- O estudo da influência do tipo de cultivo na expressão da enzima pela levedura, comparando o processo por batelada simples em frascos agitados ao com alimentação intermitente do meio com a fonte de carbono (glicerol).

Capítulo III – Materiais e Métodos

III.1 – Plasmídeo utilizado

O plasmídeo utilizado para o estudo foi sintetizado pela empresa *Epoch Life Science Inc*, utilizando o vetor pGAPZαB da empresa *Invitrogen*, e contendo como inserto o gene de L-asparaginase de *Zymomonas mobilis*, conforme utilizado por EINSFELDT (2014), otimizado para *Pichia pastoris* pela utilização de códons mais freqüentes na levedura. Foram inseridos à sequência sítios de restrição para clivagem pelas enzimas *XhoI* e *XbaI*. O vetor pGAPZαB apresenta um promotor constitutivo da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAP), uma sequência sinalizadora para exportação da proteína traduzida para o meio extracelular (fator α de *Saccharomyces cerevisiae*), uma cauda poli-histidina, visando possivelmente uma posterior purificação, e a sequência do gene *Shble*, que confere resistência ao antibiótico Zeocina. Para fins de identificação, a construção foi chamada de pGAPZαZmA (*Zymomonas mobilis* asparaginase), e o seu mapa está representada na figura 5.

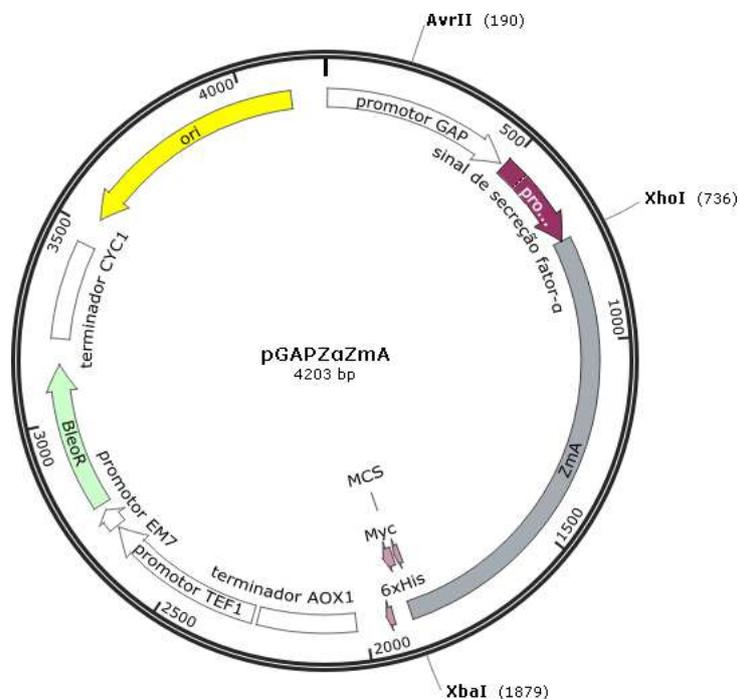


Figura 5 – Mapa da construção pGAPZαZmA, evidenciando as regiões do promotor, do gene de L-asparaginase otimizado para *Pichia pastoris*, da sequência sinalizadora e da cauda poli-histidina, bem como os sítios de restrição utilizados (gerada pelo software SnapGene®).

III.2 – Microrganismos utilizados

A bactéria *Escherichia coli* da linhagem JM109 (genótipo: F' traD36 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17) foi utilizada neste trabalho a fim de amplificar, confirmar e estocar o plasmídeo recebido. Para tanto, foi utilizada uma alíquota de estoque desta cepa oriunda do Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas. A levedura *Pichia pastoris* da linhagem X33 foi utilizada para inserção e expressão do gene de interesse correspondente a asparaginase de *Zymomonas mobilis* (ZmA).

III.3 – Preparo de células competentes e transformação em *E. coli*

A cepa JM109 de *E. coli* foi submetida a um processo de preparação de células competentes para eletroporação, conforme representado na figura 6.

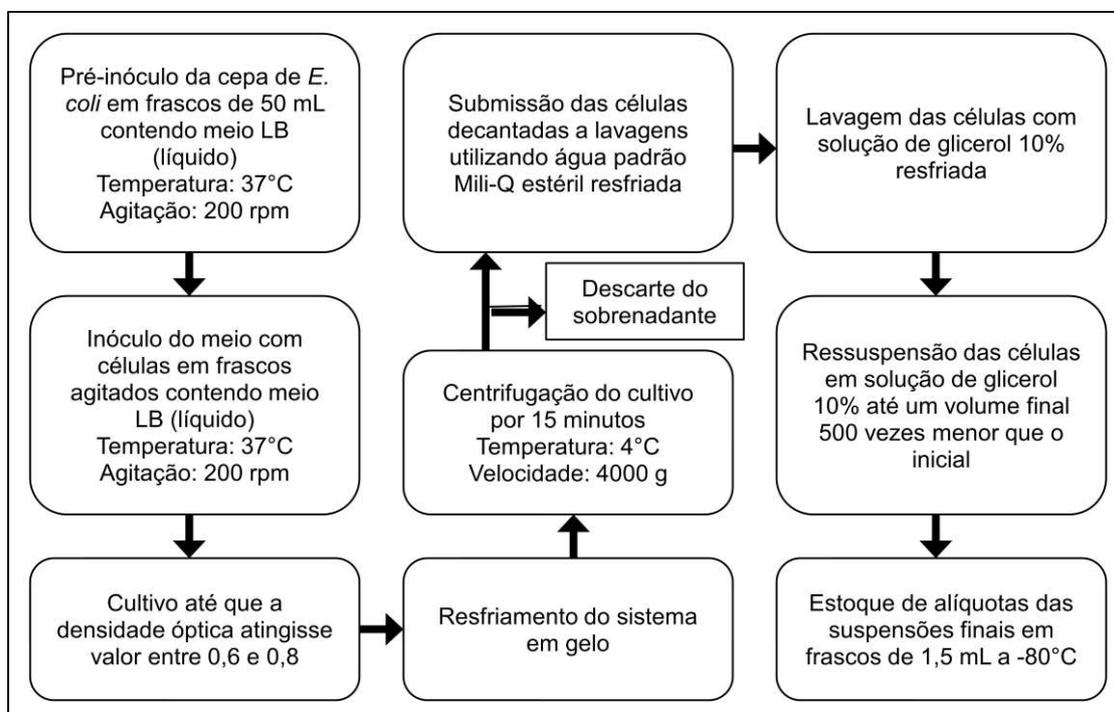


Figura 6 – Fluxograma de preparo de células competentes de *Escherichia coli*. O meio LB líquido é composto por extrato de levedura 5 g/L, peptona 10 g/L e cloreto de sódio 10 g/L. As etapas de lavagem se dão pela repetição de etapas de ressuspensão das células, centrifugação a 4000 g e 4°C e descarte do sobrenadante.

A uma das alíquotas de células obtidas, previamente removida do freezer a -80°C e aquecida por contato com gelo a aproximadamente 0°C , foram adicionados $2\ \mu\text{L}$ da solução contendo o plasmídeo pGAPZ α ZmA. O frasco contendo a suspensão permaneceu mergulhado no gelo por 4,5 minutos, após os quais a suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação, que foi posicionada nos eletrodos de um eletroporador, sendo então submetida a um pulso (voltagem de 2,5 kV, capacitância de $25\ \mu\text{F}$ e resistência de $200\ \Omega$) para incorporação dos plasmídeos pelas células. Foi adicionado então à cubeta 1 mL de meio LB e, em seguida, todo o material foi transferido para um tubo de 1,5 mL, sendo então submetido à incubação a 37°C sob agitação de 650 rpm, por 30 minutos. Após a incubação, o material foi centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos, tendo o sobrenadante descartado e as células decantadas ressuspensas com $100\ \mu\text{L}$ de meio LB.

Foi então realizado o plaqueamento de alíquotas de 20 e $80\ \mu\text{L}$ da célula transformada em meio LB Low Salt sólido (extrato de levedura 5 g/L, triptona 10 g/L e cloreto de sódio 5g/L, ágar 20 g/L), contendo o antibiótico seletivo Zeocina, ao qual o plasmídeo conferiria resistência, na concentração de $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas, a fim de permitir o crescimento das células transformadas. Foi também realizado um controle negativo, através do plaqueamento da célula não transformada em meio contendo Zeocina, e um controle positivo, através do plaqueamento em meio livre de Zeocina da célula não-transformada.

Foram escolhidas então cinco amostras das células que cresceram no meio sólido para crescimento em meio LB Low Salt líquido em frascos de 50 mL contendo Zeocina na concentração de $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram incubadas a 37°C , com agitação a 200 rpm, por 16 horas. Então, essas amostras foram identificadas, numeradas e estocadas em glicerol em concentração aproximada de 25% (m/v), à temperatura de -80°C .

III.4 – Extração plasmidial

Dois entre os cinco transformantes foram inoculados em tubos de 50 mL, cada um contendo 5 mL de meio LB Low Salt contendo Zeocina na concentração de $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$. Os frascos foram incubados a 37°C sob agitação

constante de 250 rpm, pelo período de aproximadamente 20 horas. Após esse tempo, o conteúdo dos tubos foi centrifugado, e as células submetidas ao procedimento de extração plasmidial conforme o protocolo da QIAGEN (catálogo número 27104), utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep, e seguindo o processo mostrado na figura 7.

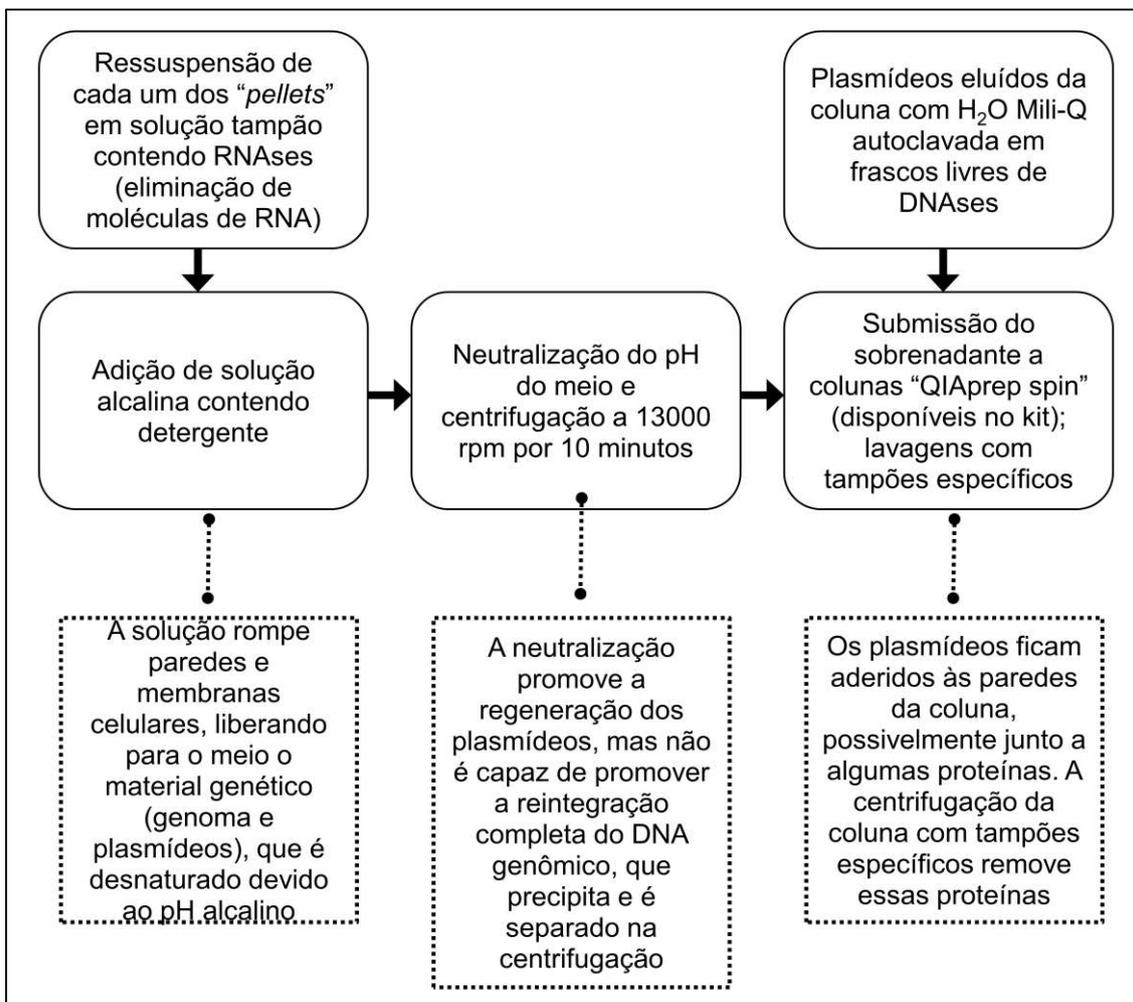


Figura 7 – Procedimento de extração plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep, da QIAGEN

O material genético obtido pela extração plasmidial foi quantificado através de leitura de absorvância a 260 nm e estocado a -20°C.

III.5 – Confirmação da clonagem em *E. coli*

A fim de confirmar a presença do plasmídeo no material extraído, realizou-se uma digestão com as enzimas *Xho*I e *Xba*I da empresa New England Biolabs Inc., uma vez que o material encomendado teria sítios de restrição para tais enzimas, nas porções inicial e final do inserto, e somente nessas regiões. Portanto, a digestão separaria os plasmídeos em dois fragmentos – o inserto e o vetor.

A digestão foi realizada através da adição de 1 µl da enzima *Xho*I e 1 µL da enzima *Xba*I a um tubo contendo uma alíquota de 7 µL da amostra resultante da extração plasmidial, juntamente com 1 µL do tampão CutSmart 1:10 (acetato de potássio 50 mM, tris-acetato 20 mM, acetato de magnésio 10 mM, soro de albumina bovina 100 µg/mL, pH 7,9 a 25°C) da empresa New England Biolabs Inc. A reação foi incubada a 37°C pelo período de 4 horas.

Após esse procedimento, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, comparando amostras do plasmídeo fechado e da digestão realizada à amostra de massas do padrão Generuler 1kb DNA Ladder da empresa Fermentas™, tendo por finalidade verificar se os fragmentos obtidos corresponderiam de fato aos tamanhos de vetor e de inserto esperados. O gel obtido foi corado por submersão em solução de brometo de etídio 1 µg/mL pelo período de 15 minutos, e analisado sob luz ultravioleta.

III.6 – Preparo de células competentes e transformação em *P. pastoris*

III.6.1 – Linearização plasmidial

Anteriormente à realização da transformação em *Pichia pastoris*, o plasmídeo extraído teve de ser clivado em um sítio de restrição, a fim de torná-lo linear e permitir a sua incorporação por recombinação homóloga ao genoma da levedura. Para isso, foi utilizada a enzima *Avr*II, para a qual a construção possui sítio de restrição dentro da sequência do promotor GAP.

A digestão foi realizada de maneira semelhante à anterior, adicionando-se uma quantidade pré-determinada da enzima *Avr*II da empresa New England

Biolabs Inc a tubos contendo todo o material genético resultante da extração e o tampão CutSmart também da empresa New England Biolabs Inc. Os tubos foram mantidos a 37°C sob agitação constante, pelo período de 16 horas.

Em seguida, a linearização foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 1%, realizada de maneira idêntica à do item III.4.

A suspensão contendo o material genético linearizado foi então submetido a concentração por procedimento de precipitação. Para tanto, primeiramente, foi adicionada à mesma 10% (v/v) de solução de acetato de sódio 3 M, de pH 5,2, agitando, em seguida, a mistura. Então, foram adicionados 2 mL de etanol absoluto. A mistura foi resfriada a 20°C, permanecendo incubada a essa temperatura *overnight*. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 4°C por 10 minutos e 13500 rpm, tendo seu sobrenadante descartado. O material precipitado foi então lavado com solução de etanol 70%, através de ressuspensão em 1 mL da solução, centrifugação e descarte do sobrenadante, em um total de duas vezes. O etanol residual foi então removido por centrifugação a vácuo, e o material genético linearizado foi ressuspendido em água padrão Mili-Q.

III.6.2 – Preparação de *P. pastoris* competente

Foi realizado primeiramente um pré-inóculo da cepa de *Pichia pastoris* em 5 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 1%, glicose 2%), que foi mantido a 30°C e 250 rpm por aproximadamente 24 horas. Em seguida, a partir desse pré-inóculo, foi realizado um inóculo em 500 mL de meio YPD, que foi mantido sob as mesmas condições de incubação do pré-inóculo até atingir uma densidade óptica a 600 nm entre 1,3 e 1,5. O frasco contendo o meio com células foi então resfriado por submersão em gelo, sendo, em seguida, centrifugado a 4°C e 1500 g por 5 minutos, e seu sobrenadante descartado. As células decantadas foram então submetidas a duas lavagens com água padrão MiliQ resfriada, através de centrifugação, ressuspensão e descarte do sobrenadante, e mais duas lavagens com sorbitol 1 M, atingindo um volume final de aproximadamente 1,5 mL armazenado em gelo para utilização no mesmo dia.

III.6.3 – Transformação em *P. pastoris*

A uma alíquota de 1,5 mL de *Pichia pastoris* competente foi adicionado o material genético previamente linearizado. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação resfriada, a qual foi submetida a um pulso (voltagem de 2 kV, capacitância de 25 μ F e resistência de 200 Ω). Foi adicionado então à cubeta um mL de solução 1 M de sorbitol, e todo o material no interior da mesma foi transferido para um tubo de 15 mL, dentro do qual permaneceu incubado a 30°C, sem agitação, por uma hora.

A suspensão foi então diluída em 10 vezes, e alíquotas de 20 e 80 μ L, tanto da suspensão original quanto da diluída, foram plaqueadas em meio YPD sólido contendo o antibiótico Zeocina na concentração de 100 μ g/mL. As placas foram mantidas incubadas a 30°C por quatro dias.

Foram escolhidas ao acaso 18 colônias para crescimento em meio YPD contendo Zeocina 100 μ g/mL em tubos de 50 mL, que foram mantidos a 30°C sob agitação constante de 250 rpm por um período que variou de 1 a 5 dias, tendo por finalidade confirmar o sucesso da transformação nessas colônias através da sua resistência ao antibiótico. Foram realizados também dois grupos controle, através do inóculo da levedura X33 não transformada a tubos contendo meio YPD com Zeocina na mesma concentração, e submissão desses grupos às mesmas condições de crescimento.

Foram realizados estoques com glicerol 25% das leveduras que cresceram em meio contendo antibiótico, que foram mantidos a -80°C.

III.7 – Seleção dos transformantes

O critério utilizado para realizar a seleção dos melhores transformantes foi a capacidade de crescer em meio contendo maiores concentrações do antibiótico Zeocina, o que indicaria um maior número de cópias do plasmídeo incorporadas ao genoma e assim uma possível maior expressão do gene de interesse.

Para tanto, foi primeiramente realizado um pré-inóculo de cada um dos clones e da cepa não transformada em tubos de 50 mL contendo meio YPD e

Zeocina na concentração de 100 µg/mL, que foram incubados a 30°C sob agitação constante de 250 rpm por aproximadamente 20 horas. Após esse período, foram retiradas amostras de cada um dos tubos, e sua densidade óptica foi medida por espectrofotometria a 600 nm, de forma a padronizar as concentrações celulares de cada um dos crescimentos celulares, por diluição em meio YPD em placa de 96 poços. Em seguida, foram transferidas gotículas de igual volume das amostras padronizadas para quatro placas, numeradas de 1 a 4, cada uma contendo meio YPD com agar e o antibiótico Zeocina nas concentrações de 100 µg/mL na placa 1, 200 µg/mL na placa 2, 500 µg/mL na placa 3 e 1000 µg/mL na placa 4. As placas foram fechadas e incubadas a 30°C, e analisadas após os períodos de 24 e 48 horas de crescimento.

III.8 – Curva de massa seca

Foram realizadas curvas de massa seca da cepa *Pichia pastoris*. Para tal, foram retiradas amostras do crescimento celular da cepa em meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicerol 1%, YNB 1,34 g/L, tampão fosfato de potássio pH = 6,0 0,1 M e biotina 1,25 g/L), que foram diluídas em diferentes proporções de água destilada, em triplicata. As amostras diluídas tiveram então as suas densidades ópticas a 600 nm medidas. Paralelamente, foram retiradas duas alíquotas de 20 mL do meio de cultivo, que foram transferidas a tubos de 50 mL, de massa conhecida por medição em balança analítica. A densidade óptica do meio contendo células foi medida no momento da retirada das amostras. Os tubos contendo células foram então expostos a secagem em estufa até evaporação completa da água, medindo-se, em seguida, a massa do conjunto (tubo com células). Desta forma, subtraindo-se a massa do tubo do conjunto tubo/massa celular, foi possível conhecer a concentração, em g/L, das amostras retiradas. Comparando tais concentrações às densidades ópticas das mesmas amostras diluídas, foi possível construir as curvas de massa seca.

III.9 – Curva de crescimento em meio BMGY

Foi realizado um pré-inóculo dos dois clones selecionados em tubos de 50 mL contendo meio YPD com Zeocina 100 µg/mL, juntamente com um pré-inóculo da cepa X33 sem plasmídeos em tubo de 50 mL contendo meio YPD livre de antibióticos. Os três tubos foram incubados a 30°C sob agitação constante de 250 rpm, pelo período de aproximadamente 16 horas, ao final das quais suas densidades ópticas foram medidas por espectrofotometria a 600 nm.

Uma alíquota de cada um dos tubos foi então adicionada a frascos agitados contendo 250 mL de meio para expressão BMGY, de forma que a densidade óptica inicial de cada um dos frascos inoculados fosse igual a 0,1. Os frascos foram então incubados a 30°C sob agitação constante de 250 rpm. Após intervalos de tempo regulares de 2 horas, uma alíquota de aproximadamente 1 mL foi retirada de cada um dos frascos, de modo a medir a sua densidade óptica por espectrofotometria a 600 nm, de forma a avaliar o crescimento celular de cada amostra.

O procedimento foi repetido até que as três cepas atingissem a fase estacionária de crescimento, ou seja, apresentassem densidade óptica aproximadamente constante ao longo do tempo. Foram então traçadas curvas de concentração celular (comparando as densidades ópticas obtidas à curva de massa seca) por tempo de crescimento para as três cepas.

Posteriormente, foi construída uma nova curva de crescimento com somente um dos clones selecionados, em duplicata, para dosagem em intervalos de tempo regulares não só da densidade óptica, como também da concentração de glicerol remanescente no meio de cultivo. As amostragens foram realizadas até que todo o glicerol do meio fosse consumido.

III.10 – Dosagem do glicerol no meio de cultivo

A dosagem de glicerol foi realizada através da utilização do kit de dosagem de triglicerídeos Bioclin. O procedimento de dosagem do glicerol consiste na adição de 1 mL do Reagente nº 1 enzimático fornecido (tampão, 4-clorofenol < 5 mmol/L, lipase lipoproteica < 5000U/L, glicerol kinase < 3000

U/L, peroxidase < 5000 U/L, glicerol-3-fosfato oxidase < 5000 U/L, 4-aminoantipirina < 1 mmol/L, ATP < 5 mmol/L, ativador, estabilizante, surfactante e conservante) a 10 µL do sobrenadante obtido pela centrifugação da amostra recolhida, com posterior incubação a 37°C por 10 minutos, e leitura da absorbância das amostras a 500 nm. As absorbâncias das amostras foram comparadas a uma curva-padrão previamente realizada com concentrações conhecidas de glicerol.

III.11 – Expressão em frascos agitados

Foram realizados pré-inóculos e inóculos dos clones selecionados e da cepa X33 em condições idênticas às da etapa de construção das curvas de crescimento. Os frascos foram então incubados a 30°C sob agitação constante de 250 rpm, de forma a repetir as condições de cultivo do experimento anterior. Com base nas curvas construídas, foram recolhidas alíquotas de aproximadamente 30 mL de cada frasco em tempos de crescimento que corresponderiam às etapas inicial, intermediária e final da fase exponencial de crescimento de cada uma das cepas. Essas alíquotas, que deveriam conter meio nutritivo, células e proteínas no meio, destacando-se a asparaginase, foram centrifugadas e seu sobrenadante foi filtrado, de modo a livrar as amostras de células.

As amostras livres de células foram então submetidas a lavagens em tubos de ultracentrifugação com solução de manitol 0,55 g/L, de modo a realizar a substituição do meio nutritivo pela solução, que, segundo EINSFELDT (2014), permite uma maior conservação e estabilidade da atividade da enzima L-asparaginase estudada. Os tubos foram também utilizados para a concentração das amostras em 10 vezes.

III.12 – Dosagem de proteínas totais

Foi realizado um procedimento de dosagem de proteínas totais dos extratos concentrados segundo BRADFORD (1976). Para tanto, foram adicionados, em triplicata, 190 µL do reagente de Bradford (corante Comassie

G-250, metanol, ácido fosfórico e água) a 10 µL das amostras a serem analisadas, em diluição apropriada. A reação de complexação, que confere, na presença de proteínas, uma coloração azulada ao reagente, que possui cor marrom avermelhada na ausência de proteínas, ocorreu por aproximadamente 5 minutos, após os quais foi medida a absorvância dos meios reacionais a 595 nm.

Os valores de absorvância obtidos foram então comparados a uma curva-padrão construída pela submissão de soluções de concentração conhecida, variando de 0 a 400 mg/L de soro de albumina bovina (BSA) ao mesmo procedimento de complexação, de forma a se obter as concentrações de proteínas totais em cada amostra.

III.13 – Eletroforese em gel de poliacrilamida

A fim de se confirmar a expressão da enzima L-asparaginase, os sobrenadantes provenientes das expressões realizadas foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida. Foram adicionados a amostras de 15 µL dos extratos concentrados, 5 µL de tampão Tris-HCl 60 mM pH 6,8, 10% de glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 2% de SDS e 0,5% de azul de bromofenol. As misturas foram então incubadas em banho de água fervente por 5 minutos, e aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, juntamente com o padrão de massas moleculares BenchMark da marca Invitrogen™ que foi submetido a uma eletroforese a voltagem de 120V e amperagem igual a 40mA em tampão de corrida (3 g/L de Tris Base, 14,5 g/L de glicina, 0,1 g/L de SDS e pH 8,3) (LAEMMLI, 1970). O gel foi então corado usando Coomassie Blue R-250 por aproximadamente um dia, e descorado em água.

III.14 – Dosagem de atividade enzimática

III.14.1 – Extracelular

A dosagem de atividade enzimática foi realizada segundo o método de TABACCO *et al.* (1979) de dosagem de amônio. Uma vez que a enzima

asparaginase catalisa a hidrólise da asparagina em aspartato e amônio (conforme mostrado na figura 8), em proporções equimolares, a medida de atividade é baseada no aumento da concentração de amônio no meio. Dessa forma, uma unidade internacional (UI) de asparaginase é definida como a quantidade da enzima necessária para liberar 1 μmol de amônio por minuto a 37°C em pH igual a 7,3.

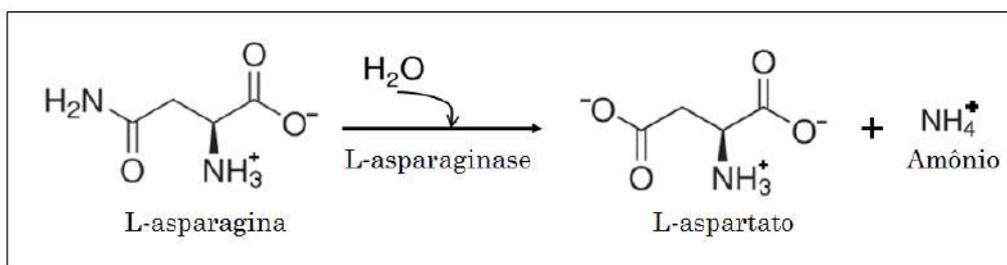


Figura 8 – Reação de hidrólise da asparagina sob a ação da enzima L-asparaginase, convertendo-a a aspartato e liberando amônio.

O método utilizado conta com a reação de complexação de duas soluções – sendo uma, chamada de “Reagente 1”, composta de salicilato de sódio 60 mM, nitroprussiato de sódio 3,4 mM e EDTA dissódico 1,35 mM, e a outra, a qual recebeu a denominação de “Reagente 2”, composta de hidróxido de sódio 150 mM e hipoclorito de sódio 4,8 mM – com o amônio, formando um composto de coloração azul esverdeada, que pode ser quantificada a partir de leitura a 600 nm.

Primeiramente, foram adicionadas, em triplicata, alíquotas de 50 μL de cada uma das amostras de conteúdo enzimático a um frasco de 1,5 mL contendo 50 μL de solução de L-asparagina 5 g/L em tampão fosfato de sódio 0,02 M e pH = 7,3. Também foram feitos em outros frascos controles de amostra, contendo 50 μL de amostra de enzima e 50 μL de tampão fosfato, controles de L-asparagina, contendo 50 μL da solução de asparagina e 50 μL de tampão fosfato, também em triplicata, e controles de tampão, contendo 100 μL de tampão fosfato. Os tubos de reação, bem como os de controle, foram incubados a 37°C por trinta minutos a fim de permitir que ocorresse a reação de hidrólise. Ao final desse tempo, realizou-se a interrupção da reação adicionando-se 40 μL de cada um dos frascos a tubos de 15 mL contendo, cada um, 10 μL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M. A cada um desses tubos,

foram adicionados 2 mL do “Reagente 1”, agitando o tubo em seguida, e mais 2 mL do “Reagente 2”, seguido de nova agitação do tubo. Os tubos foram então incubados a 37°C por cinco minutos, de forma a completar a reação de complexação. Cada uma das amostras dos tubos foi então submetida a leitura a 600 nm, e as absorvâncias foram comparadas a uma curva-padrão de amônio previamente realizada, utilizando soluções padrão de sulfato de amônio a concentrações conhecidas, permitindo, então, a quantificação do amônio liberado em cada um dos meios reacionais.

A atividade da enzima L-asparaginase foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade (UI/mL)} = \frac{\text{Abs}_{600\text{nm}}}{\text{fc} * \text{t} * \text{V} * \text{C}}$$

Onde:

- “Abs_{600nm}” é o valor de absorvância encontrado;
- “fc” é o fator de conversão dado pelo coeficiente angular da curva-padrão de amônio;
- “t” corresponde ao tempo de reação, igual a 30 minutos;
- “V” é o volume, em mililitros, de amostra analisada, igual a 0,02 mL;
- “C” corresponde a quantas vezes a amostra foi concentrada no procedimento de lavagem, assumindo um valor igual a 10 vezes.

III.14.2 – Utilizando as células íntegras

A fim de poder estudar a possibilidade de retenção da L-asparaginase no periplasma da levedura, foi realizado o teste de atividade enzimática utilizando, em vez do sobrenadante concentrado, amostras das células íntegras, oriundas da parcela decantada no processo de centrifugação.

Primeiramente, essas amostras foram ressuspensas com solução de manitol 0,55 g/L e centrifugadas, em um total de três vezes, de forma a eliminar traços de amônio presentes no meio de cultivo. Em seguida, foram diluídas em tampão fosfato de sódio 0,02 M e pH 7,3, de forma que suas absorvâncias a 600 nm finais fossem iguais a 0,6. Em seguida, adicionou-se a 4 mL dessas suspensões 1 mL de solução de L-asparagina 0,05 M, mantendo as

suspensões sob agitação a 37°C, por 30 minutos. Foram recolhidas alíquotas ao início e ao fim desse período, às quais foi adicionada solução 1,5 M de TCA na proporção de 1:10, a fim de se interromper a reação de hidrólise. Em seguida, essas alíquotas foram centrifugadas, e os sobrenadantes resultantes dessa etapa foram submetidos à reação de complexação e leitura em espectrofotômetro conforme o item anterior (FERRARA, 2004). A atividade enzimática foi medida conforme a fórmula exposta no item III.14.1.

III.15 – Expressão em frascos agitados com alimentação

Realizou-se o cultivo em duplicata da cepa selecionada nas mesmas condições iniciais dos procedimentos anteriores. Após aproximadamente 24 horas de crescimento, foi retirada uma alíquota para dosagem da densidade óptica, bem como da concentração de glicerol remanescente no meio, conforme descrito anteriormente. Também foi retirada uma amostra de 20 mL a fim de realizar o procedimento de concentração e lavagem do meio de cultivo com manitol, e dosagem da atividade enzimática. Com base no resultado da dosagem de glicerol, foi adicionado a cada um dos frascos agitados um volume de solução de glicerol 10%, de forma que a concentração no meio de cultivo voltasse ao valor inicial de 1%. Foi realizada nova amostragem e alimentação de maneira equivalente após 48 horas de cultivo (24 horas após a primeira alimentação), bem como retirada de amostra para dosagem de atividade enzimática. Após 72 horas de cultivo, foi retirada uma última amostra para dosagem de atividade enzimática.

Capítulo IV – Resultados e Discussão

IV.1 – Transformação em *E. coli*

A clonagem do plasmídeo pGAPZαZmA em *Escherichia coli* JM109 foi bem sucedida, sendo possível o crescimento de uma quantidade considerável de colônias em meio LB sólido contendo Zeocina, conforme ilustrado pela figura 9(a). Desta placa, foram escolhidas ao acaso cinco colônias, que foram repicadas em meio LB líquido contendo Zeocina 50 µg/mL, e incubadas a 37°C e 250 rpm, a fim de se permitir o estoque das cinco cepas a -80°C. A presença do plasmídeo pode ser confirmada por extração plasmidial de dois desses estoques, seguida de digestão com as enzimas *Xho*I e *Xba*I, e eletroforese em gel de agarose, comparando-se o padrão eletroforético do plasmídeo fechado e dos produtos da digestão com o padrão de massas, evidenciando, conforme mostra a figura 9(b), a presença de um fragmento de, aproximadamente, 1150 pares de bases, que corresponde ao gene inserido.

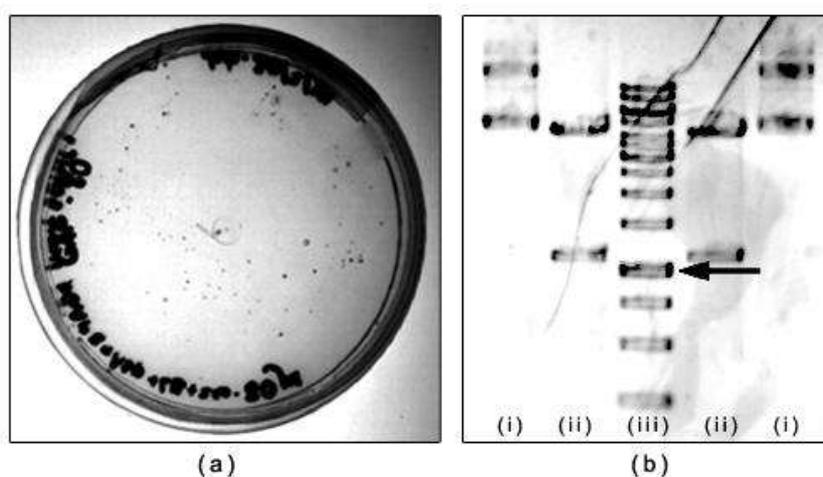


Figura 9 – (a) Plaqueamento das cepas de *E. coli* provenientes da eletroporação com o plasmídeo pGAPZαZmA em meio sólido com antibiótico, na qual foi possível observar o crescimento de muitas colônias. (b) Padrão eletroforético em gel de agarose 1%. As colunas indicadas com (i) correspondem ao plasmídeo fechado e as com (ii) correspondem aos produtos das digestões com as enzimas de restrição *Xho*I e *Xba*I, enquanto que a coluna (iii) corresponde ao padrão de massas moleculares. A seta indica a região do padrão correspondente a 1000 pares de bases, bastante próxima à altura do inserto.

Da mesma forma, a linearização do plasmídeo utilizando a enzima de restrição *Avr*II foi confirmada por comparação do produto da digestão do

plasmídeo em gel de agarose com o padrão de massas moleculares, revelando um fragmento de aproximadamente 4300 pares de bases, conforme mostra a figura 10.



Figura 10 – Padrão eletroforético em gel de agarose 1%. A coluna (i) corresponde ao produto da digestão do plasmídeo pGAPZαZmA com a enzima de restrição *AvrII*, enquanto a coluna (ii) corresponde ao padrão de massas moleculares. A seta indica a região do padrão de massas moleculares correspondente a 4000 pares de bases.

IV.2 – Transformação em *P. pastoris*

A clonagem do plasmídeo linearizado em *Pichia pastoris* X33 também foi bem-sucedida, obtendo-se uma grande quantidade de colônias em meio YPD sólido contendo Zeocina, como mostrado na figura 11. Foram escolhidas 18 dessas colônias para crescimento em meio YPD líquido contendo antibiótico, observando-se crescimento de 17 delas depois de até cinco dias de crescimento. Os meios contendo células foram estocados em ultrafreezer a -80°C .

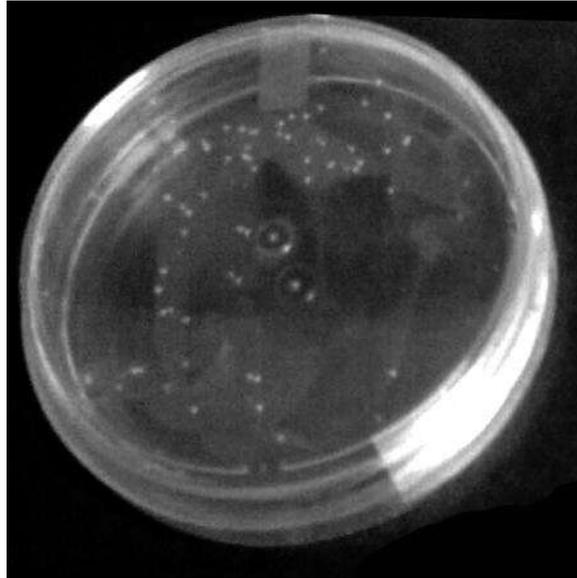


Figura 11 – Plaqueamento em meio sólido contendo antibiótico das cepas de *P. pastoris* provenientes da eletroporação com o gene ZmA.

IV.3 – Seleção dos transformantes

A figura 12 evidencia o crescimento dos 17 transformantes nos meios YPD sólidos contendo diferentes concentrações de Zeocina, após 24 e 48 horas de incubação a 30°C.

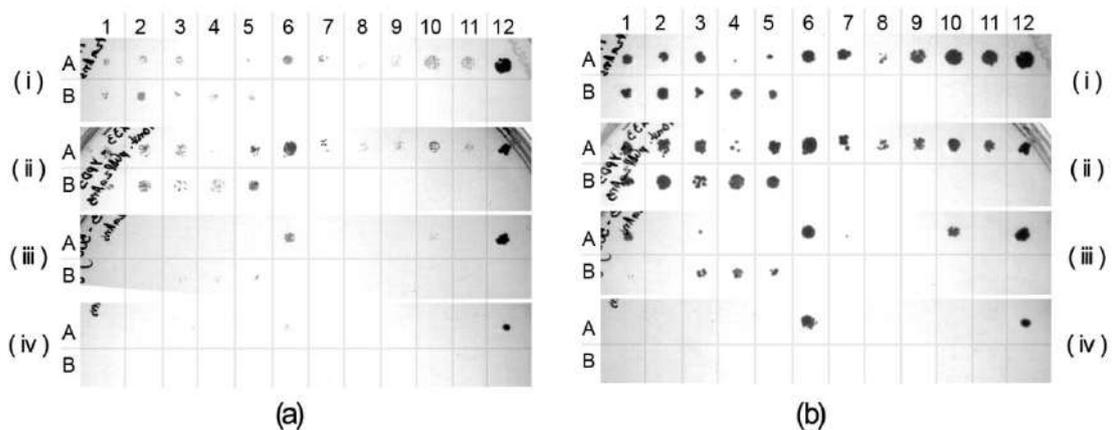


Figura 12 – Crescimento das 17 cepas de *P. pastoris* em meio YPD sólido contendo (i) 100µg/mL; (ii) 200µg/mL; (iii) 500µg/mL e (iv) 1000µg/mL de Zeocina, após (a) 24 e (b) 48 horas de incubação. Os poços de A-1 a A-12 correspondem aos clones identificados de 1 a 12; os poços de B-1 a B-5 correspondem aos clones identificados como 13, 14, 15, 17 e 18.

Como se pode notar, após 48 horas de incubação, todos os transformantes cresceram a 100 e a 200 µg/mL. No entanto, somente os clones

identificados como 6, 10, 12, 15, 17 e 18 cresceram a 500 µg/mL de Zeocina e, na concentração de 1000 µg/mL, apenas os clones identificados como 6 e 12, que serão, a partir de agora, referidos como Clone 6 e Clone 12, obtiveram crescimento após 48 horas. Portanto, uma vez que a resistência à Zeocina é proporcional ao número de cópias do plasmídeo incorporadas ao genoma, foi possível inferir que os Clones 6 e 12 foram aqueles com maior número de cópias do gene inserido, o que permite a suposição de que são, dentre os analisados, os maiores produtores da enzima desejada.

IV.4 – Ensaios com os transformantes selecionados

IV.4.1 – Curvas de crescimento

A figura 13 mostra o perfil de crescimento dos clones selecionados, bem como o da cepa X33 não transformada, em frascos agitados a 250 rpm à temperatura de 30°C, tendo uma concentração inicial de células igual a 0,05g/L.

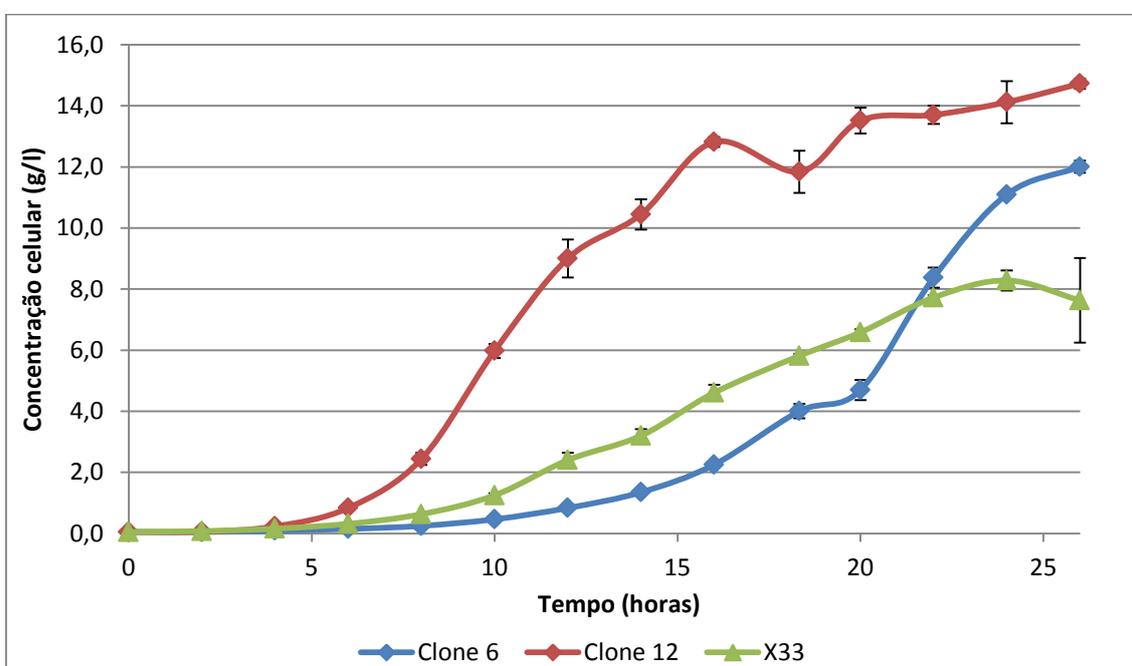


Figura 13 – Perfil de concentração celular das cepas de *P. pastoris* identificadas como Clone 6 e Clone 12, contendo o gene *ZmA*, e da cepa X33 sem o plasmídeo, sob agitação constante e a 30°C, ao longo de 26 horas de crescimento em batelada simples.

Foi possível notar, através de cálculo de linearização das concentrações celulares ao longo do crescimento, que a levedura não transformada atingiu a fase exponencial de crescimento após aproximadamente 2 horas, chegando à fase estacionária após 24 horas. O Clone 6, por sua vez, atingiu a fase exponencial de crescimento após 4 horas, tendo seu crescimento freado em 12 g/L, após 26 horas. O Clone 12 teve sua fase exponencial iniciada após 4 horas de crescimento, atingindo, com 16 g/L, a fase estacionária após 13 horas.

Pode-se justificar a elevada concentração de células ao final do crescimento dos clones em comparação com a cepa que não continha o gene, o que poderia caracterizar uma situação anômala, pelo fato de os crescimentos das cepas modificadas terem sido realizados em frascos com pequenas reentrâncias no fundo com função de aletas, permitindo uma maior aeração do meio, promovendo uma maior disponibilidade de oxigênio para as células presentes no meio, fazendo com que elas atingissem uma maior concentração celular. O crescimento da cepa que não continha o gene foi realizado em um frasco comum.

Por outro lado, observa-se também que o Clone 6 apresentou um crescimento mais lento que o Clone 12, precisando de um tempo maior para chegar à fase estacionária. Esse comportamento pode ser considerado uma confirmação do que havia sido observado no crescimento dos clones na seleção por número de cópias: é perceptível, conforme mostrado na figura 12, que, após 24 horas de crescimento, o Clone 12 já havia formado uma colônia de tamanho considerável na placa contendo 1000 µg/mL, enquanto o Clone 6 parecia ainda estar se adaptando ao meio. Após 48 horas, as colônias correspondentes aos dois transformantes haviam atingido um tamanho semelhante. Essa diferença das taxas de crescimento possivelmente se deve à diferença no número de cópias do gene inseridas no genoma de cada um dos clones, e ao local em que essas cópias foram inseridas.

Na literatura, é possível se encontrar exemplos de crescimento celular diferenciado devido à diferença do número de cópias de um gene inserido ao genoma celular em *Pichia pastoris*. ZHENG *et al.* (2014), por exemplo, perceberam uma relação de diminuição da taxa de crescimento da cepa *P. pastoris* em meio YPD conforme o aumento do número de cópias do gene de expressão da enzima mananase inseridas ao genoma utilizando o promotor

pGAP, bem como a formação de colônias de tamanho distinto em meio sólido também devido à diferença no número de cópias do gene. De maneira semelhante, ZHU *et al.* (2011), ao realizar a expressão da pró-insulina suína (PIP) em *P. pastoris* utilizando um promotor indutivo, constataram que, após a indução com metanol, as cepas que apresentavam um maior número de cópias do gene exógeno obtiveram taxas de crescimento celular inferior às que as continham menos cópias do mesmo gene.

Esta suposição como explicação para a diferença do crescimento entre o Clone 6 e o Clone 12, entretanto, só poderá ser comprovada após experimentos futuros de sequenciamento do DNA de cada um dos clones.

IV.4.2 – Análise da expressão da enzima L-asparaginase

A figura 14 evidencia o padrão eletroforético em gel SDS-PAGE dos extratos enzimáticos concentrados, de pontos retirados dos cultivos para expressão da cepa não transformada (X33), do Clone 6 e do Clone 12, lado a lado com o padrão de massas utilizado.

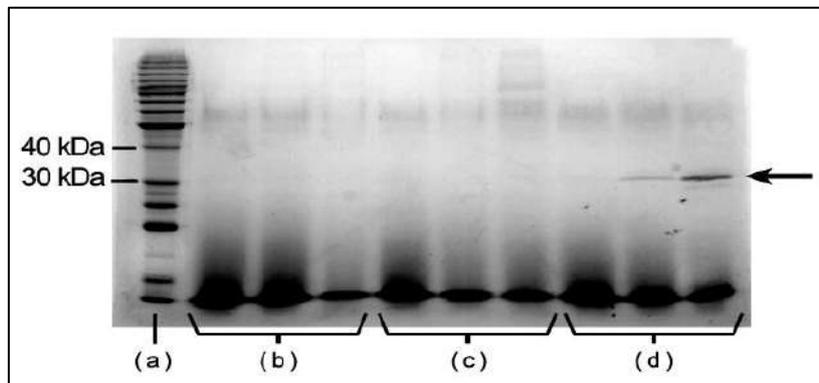


Figura 14 – Padrão eletroforético dos extratos enzimáticos concentrados, obtidos do início, meio e fim da fase exponencial de crescimento, dos cultivos (b) da cepa X33 não transformada; (c) do Clone 6 e (d) do Clone 12. A coluna identificada como (a) corresponde ao padrão de massas moleculares BenchMark da marca Invitrogen™.

É possível perceber a presença de uma banda mais forte na faixa entre 30 e 40 kDa nas duas últimas colunas do gel, o que indica que houve expressão, ao menos do Clone 12, de alguma proteína de massa molecular nessa faixa, que poderia ser a L-asparaginase, visto que a mesma possui massa molecular de aproximadamente 37 kDa.

No entanto, a eletroforese não é suficiente para confirmar a presença da enzima. Para este fim, é possível a realização posterior de mais ensaios, como uma espectrometria de massas, que fornece um valor mais exato das massas das proteínas da amostra, ou, ainda, a purificação da L-asparaginase supostamente presente utilizando coluna de níquel, visto que a cauda polihistidina adicionada à sequência da enzima permite a possibilidade da realização de uma cromatografia por afinidade utilizando o níquel como ligante. Uma nova eletroforese com a suposta enzima purificada confirmaria ou não a sua presença.

Foram também medidas, através do método da dosagem do amônio, as atividades enzimáticas de L-asparaginase dos Clones 6 e 12 em batelada simples, bem como da cepa X33 não-transformada, após intervalos de tempo conhecidos de crescimento celular, correspondentes ao início, meio e fim da fase exponencial de crescimento de cada uma das cepas. Também foram retiradas amostras após as mesmas terem alcançado a fase estacionária a fim de realizar os ensaios de atividade

As tabelas 1 e 2 mostram os valores de concentração celular, concentração de proteínas totais dos meios e atividades da enzima L-asparaginase em UI por litro, bem como os rendimentos, em relação a massa de células ($Y_{UI/X}$) e massa total de proteínas no meio ($Y_{UI/g(\text{proteína})}$), das amostras de extratos enzimáticos dos crescimentos celulares do Clone 6 e do Clone 12, respectivamente.

Tabela 1 – Análise da atividade da L-asparaginase do meio de cultivo da levedura *P. pastoris* contendo o gene *ZmA* identificada como “Clone 6”

Tempo de crescimento celular	4 horas – início da fase exponencial	13 horas – fase exponencial	22 horas – fase exponencial	48 horas – fase estacionária
Atividade (UI/L)	0	0,85± 0,50	2,82± 0,25	2,73± 0,25
Concentração de células (g/L)	0,12	1,00	6,30	17,87
$Y_{UI/X}$	0	0,85	0,45	0,15
Concentração de proteínas totais (g/L)	$1,10 \times 10^{-2}$	$9,38 \times 10^{-3}$	$9,01 \times 10^{-3}$	$1,14 \times 10^{-2}$
$Y_{UI/mg(\text{proteína})}$	0	0,090	0,312	0,241

Tabela 2 – Análise da atividade da L-asparaginase do meio de cultivo da levedura *P. pastoris* contendo o gene *ZmA* identificada como “Clone 12”

Tempo de crescimento celular	4 horas – início da fase exponencial	7 horas – fase exponencial	10 horas – fase exponencial	16 horas – fase estacionária	26 horas – fase estacionária
Atividade (UI/L)	0,73± 0,28	0,37± 0,18	1,65± 0,36	0	0
Concentração de células (g/L)	0,25	1,11	2,88	12,10	14,49
$Y_{UI/X}$	2,94	0,33	0,57	0	0
Concentração de proteínas totais (g/L)	$1,42 \times 10^{-2}$	$1,15 \times 10^{-2}$	$1,04 \times 10^{-2}$	$3,02 \times 10^{-2}$	$2,45 \times 10^{-2}$
$Y_{UI/mg(\text{proteína})}$	0,051	0,032	0,158	0	0

Não houve expressão detectável da enzima L-asparaginase pela cepa X33 que não continha o plasmídeo em nenhuma das amostragens realizadas.

Notou-se, portanto, que as cepas estavam, de fato, produzindo a enzima desejada, uma vez que é notável a variação da atividade entre a cepa selvagem e as geneticamente modificadas. No entanto, os valores de atividade obtidos foram muito baixos, quando comparados aos encontrados por ABUD (2005), que, em seus estudos da enzima L-asparaginase nativa de *Zymomonas mobilis*, conseguiu obter um rendimento de atividade próximo a 46 UI/g de células em frascos agitados, e aos valores encontrados por EINSFELDT (2014), que obteve rendimentos de até 1503 UI/g de células na expressão heteróloga da enzima de *Z. mobilis* em *E. coli* recombinante em frascos agitados contendo meio rico e utilizando indução por lactose 10 g/L.

O Clone 6 apresentou os maiores valores de atividade, chegando a um rendimento de 0,45 em relação à massa de células após 22 horas de cultivo. Pode-se notar que, embora a atividade específica tenha sido mantida, sofrendo pouca alteração até 48 horas de cultivo, houve uma queda no rendimento em relação à concentração celular e à de proteínas no meio, o que sugere que o esgotamento da fonte de carbono no meio de cultivo reduz a produção da enzima, embora ainda haja algum crescimento celular.

O Clone 12, por sua vez, além de ter apresentado menores valores de atividade específica e rendimentos, apresentou expressão indetectável da enzima nas amostragens a partir de 16 horas de cultivo, o que indica que houve degradação da L-asparaginase no meio de cultivo ou a perda e degradação da enzima em algum dos processos de lavagem e concentração da amostra.

Comparando-se os resultados da eletroforese em gel (figura 14) aos valores de atividade encontrados (tabelas 1 e 2), nota-se que a concentração da enzima L-asparaginase no extrato obtido do crescimento do Clone 12 foi aparentemente superior à encontrada no extrato do Clone 6 – caso seja confirmado que a banda observada no gel corresponde de fato à enzima L-asparaginase, ao passo que o rendimento da atividade enzimática por grama de proteína encontrada para o Clone 6 foi superior, o que pode parecer, a princípio, contraditório. Contudo, uma análise mais detalhada dos dados obtidos revela que a concentração de proteínas totais presentes no meio de cultivo do Clone 6 é muito inferior à encontrada no meio do Clone 12. Dessa forma, é possível inferir que a quantidade de L-asparaginase e das demais proteínas sintetizadas e exportadas para o meio extracelular pelo Clone 6 é menor, mas a atividade da enzima é superior. Uma possível explicação para a baixa atividade da L-asparaginase produzida pelo Clone 12 seria um mau enovelamento da molécula, levando a uma estrutura tridimensional diferente da forma ativa da proteína, o que pode estar relacionado à taxa de crescimento diferenciado da cepa (conforme observado na figura 13). A aparente degradação da enzima após a chegada à fase estacionária pode também ser reflexo de um mau enovelamento.

Desta forma, tendo analisado os resultados obtidos, somente o Clone 6, que foi o que apresentou melhor desempenho, foi utilizado nos ensaios subsequentes de batelada alimentada, visando um aumento da expressão da enzima.

IV.4.3 – Análise do consumo de glicerol ao longo do tempo

A figura 15 mostra a curva de crescimento do Clone 6 ao longo do tempo, bem como a concentração de glicerol no meio. Nota-se a

reprodutibilidade do crescimento celular da cepa, levando um tempo considerável para atingir altas concentrações celulares. Pode-se notar também que o glicerol do meio de cultivo esgotou após um período entre 26 e 28 horas, tempo no qual, conforme observado anteriormente na construção da curva de crescimento (item IV.4.1), a taxa de crescimento celular cai drasticamente. Desta forma, nota-se que o esgotamento dessa fonte de carbono ocorre concomitante à supressão da duplicação celular, o que indica uma dependência do crescimento celular ao fornecimento de glicerol no meio de cultivo.

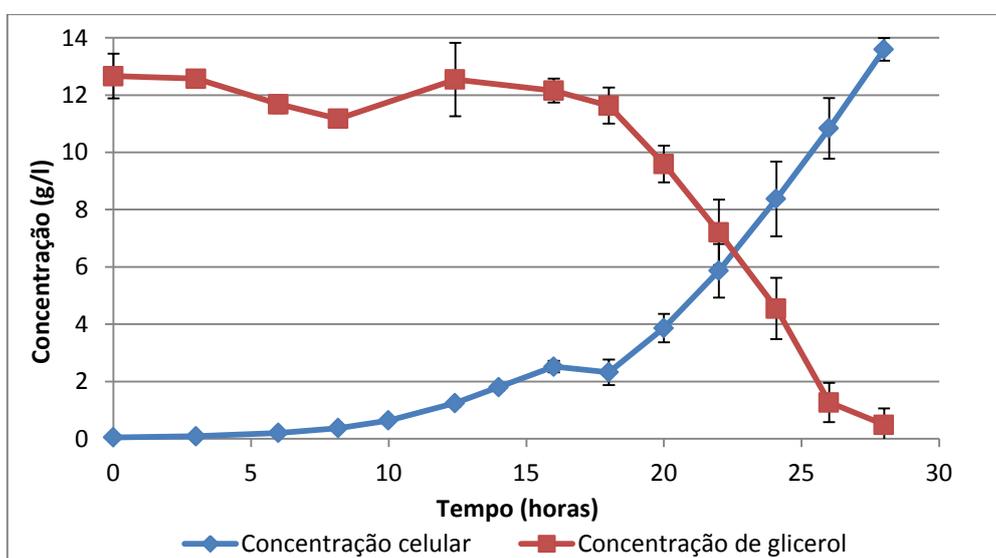


Figura 15 – Perfil de concentração celular da cepa de *P. pastoris* contendo o gene *ZmA* identificada como Clone 6 e da concentração de glicerol no meio, ao longo de 26 horas de crescimento em batelada simples, sob agitação constante e a 30°C.

IV.4.4 – Cultivo em batelada com alimentação de glicerol

A figura 16 evidencia as concentrações, em gramas por litro, de células e de glicerol no meio, ao longo do cultivo em frascos agitados feito em batelada com alimentação. A alimentação com glicerol foi realizada em um total de duas vezes, após o esgotamento do mesmo no meio de cultivo.

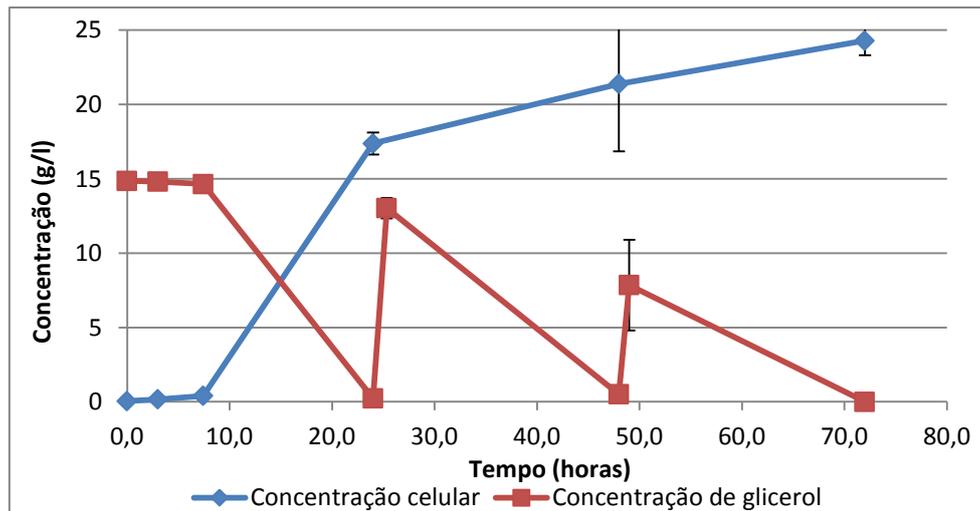


Figura 16 – Perfil de concentração celular da cepa de *P. pastoris* contendo o gene *ZmA* identificada como Clone 6 e da concentração de glicerol no meio, ao longo de 72 horas de crescimento em batelada, com alimentação com glicerol após 24 e 48 horas de cultivo, sob agitação constante e a 30°C.

Como se pode notar, não houve um grande aumento da biomassa nos frascos após as duas alimentações, que variou somente de 17,4 a 24,3 g/L em 48 horas. Pode-se atribuir essa desaceleração do crescimento a duas hipóteses distintas: uma aponta o esgotamento de outros nutrientes presentes no meio de cultivo, além da fonte de carbono, essenciais ao crescimento celular, como motivo do decaimento da taxa de crescimento; o outro supõe que, ao atingir maiores concentrações celulares, a demanda de oxigênio para a manutenção das taxas de crescimento não é suprida no cultivo. Entretanto, pelo fato de ser uma análise de expressão em frascos agitados, não há controle de percentual de oxigênio dissolvido no meio, tampouco aeração do cultivo pela injeção de ar. Dessa forma, uma estratégia viável para aumentar o suprimento de oxigênio do meio é a utilização de volumes menores de meio, de maneira a tentar aumentar o contato das células com o oxigênio disponível.

No experimento em batelada alimentada, no entanto, não houve expressão detectável da enzima L-asparaginase, o que indica que a alimentação com glicerol do meio BMGY, normalmente utilizado para cultivo somente em batelada simples, não ofereceu melhora na expressão constitutiva da enzima nas condições estudadas.

IV.4.5 – Medida da atividade utilizando as células íntegras

A análise da atividade enzimática no periplasma utilizando as células íntegras da cepa X33 não transformada e do Clone 6 não detectou expressão de L-asparaginase. Desconsiderou-se, portanto, a possibilidade da retenção da enzima no periplasma celular.

A expressão consideravelmente baixa da enzima pelos clones que foram previamente selecionados pode estar relacionada justamente ao elevado número de cópias do gene *ZmA*. A literatura indica que existe uma faixa limite de número de cópias incorporadas ao genoma dentro da qual há o aumento da expressão da enzima desejada, sendo esse limite variável de acordo com o produto expressado. Fora dessa faixa, o aumento do número de cópias pode levar a um decréscimo da expressão (HONENBLUM *et al.*, 2004; PAREKH, 1995). As explicações mais aceitas para esse efeito de dosagem limitada do gene apontam a existência de outros fatores de todo o mecanismo de expressão que acabam por se tornar limitantes a um determinado nível de número de cópias do gene (HONENBLUM *et al.*, 2004). No entanto, faz-se necessário o estudo dos níveis de expressão por parte dos outros transformantes obtidos, que apresentaram uma menor resistência ao antibiótico Zeocina, a fim de se avaliar a veracidade dessa hipótese.

Capítulo V – Conclusões

Neste trabalho, foi possível realizar a clonagem do gene da enzima L-asparaginase da bactéria *Zymomonas mobilis* na levedura *Pichia pastoris*. Por meio de crescimento em meio líquido contendo antibiótico, foram obtidos 17 transformantes contendo o gene desejado incorporados ao genoma.

A seleção dos clones por número de cópias através da resistência ao antibiótico Zeocina em meio sólido apontou dois transformantes, designados como “Clone 6” e “Clone 12” com resistência a 1000 µg/mL do antibiótico.

Foi possível observar a expressão da enzima L-asparaginase em batelada simples em frascos agitados nos dois clones selecionados, com rendimentos que atingiram 0,45 e 0,57 UI/g de célula e 0,312 e 0,158 UI/mg de proteína para os Clones 6 e 12, respectivamente, valores muito baixos quando comparados aos valores obtidos pela enzima produzida pela própria *Z. mobilis* e pela obtida pela clonagem em *E. coli*.

Foi possível constatar que a expressão no Clone 6 foi interrompida quando a cepa chegou à fase estacionária do crescimento celular, o que resultou em uma ausência de variação na atividade, em UI/mL, nessa fase, embora tenha ocorrido ainda uma pequena variação na concentração de biomassa.

No Clone 12, não foi detectada atividade da L-asparaginase após a chegada à fase estacionária, o que sugere que a enzima presente no meio sofreu algum tipo de degradação ou foi perdida nas etapas de concentração.

Não foi detectada atividade da enzima em batelada com alimentação com glicerol, indicando que o tipo de alimentação utilizado não colabora positivamente à expressão.

Também não foi detectada atividade enzimática nos ensaios utilizando as células íntegras, indicando que não há retenção no periplasma celular.

Capítulo VI – Perspectivas Futuras

Ensaio posteriores visarão buscar entender os motivos que levaram a atividade enzimática ter regredido em batelada alimentada com glicerol, bem como a proposição de outras formas de alimentação do meio e outros meios de cultivo próprios para batelada alimentada, a fim de tentar aumentar mais a concentração celular no meio do cultivo e, conseqüentemente, a expressão constitutiva da enzima L-asparaginase.

Pretende-se também dosar o número de cópias de cada transformante, bem como realizar uma varredura mais abrangente dos transformantes obtidos, e não somente aqueles que apresentaram maior resistência ao antibiótico Zeocina. Serão estudados os perfis de crescimento de outros transformantes, bem como a expressão heteróloga da L-asparaginase em cada um deles.

Por fim, ao se alcançar maiores níveis de expressão, as etapas futuras serão de caracterização da nova L-asparaginase produzida, através do estudo do seu perfil cinético, localização dos possíveis sítios de glicosilação, dentre outros, bem como o cultivo em maior escala, que poderá ser realizado em biorreator de bancada.

Capítulo VII – Referências Bibliográficas

ABUD, A.K.S., 2005, **Estudo do controle de qualidade do processo de produção de L-asparaginase por *Zymomonas mobilis***. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

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

ANDERSEN, D. C., KRUMMEN, L., 2002, “Recombinant protein expression for therapeutic applications”, **Biochemical engineering**, v.13, p. 117-123.

AW, R., POLIZZI, K. M., 2013, “Can too many copies spoil the broth?”, **Microbial Cell Factories**, v. 12, p. 128-136.

BAPTISTA, I. C., **Avaliação da Atividade Antileucêmica de LAsparaginase Recombinante de *Zymomonas mobilis***, Dissertação de M.Sc., Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica/Faculdade de Medicina/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

BROOME, J., 1961, “Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects”, **Nature**, v. 191, p. 1114–1115.

BRADFORD, M. M., 1976, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding”, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-554.

BRIERLEY, R.A., 1998, “Secretion of Recombinant Human Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I)”, **Methods in Molecular Biology**, v. 103, p. 149-177.

CALAZANS, G.M.T., LOPES, C.E., LIMA, R.M.O.C., et al., 1997, "Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains", **Biotechnology Letters**, v. 19, n.1, p. 19-21.

CAMPBELL, H., MASHBURN, L., BOYSE, E., OLD, L., 1967, "Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. Their separation, purification, and antitumor activity", **Biochemistry**, v. 6, p. 721-730.

ÇELİK, E., ÇALIK, P., 2012, "Production of a recombinant protein by yeast cells", **Biotechnology advances**, v. 30, p. 1108-1118.

CEREGHINO, G. P. L., CEREGHINO, J. L. et al., 2002, "Production of recombinant proteins in fermenter cultures of yeast *Pichia pastoris*", **Protein technologies and commercial enzymes**, v. 13, p. 329-332.

CLEMENTI, A., 1992, "La Désamination enzymatique de l'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physiologique de sa présence dans l'organisme", **Arch. Int. Physiol.**, v. 19, p. 369-376.

CÓS, O. et al., 2006, "Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review", **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 17-36.

CREGG, J. M. et al., 2009, "Expression in the Yeast *Pichia pastoris*", **Methods in Biotechnology**, v. 463, p. 169-189.

DOELLE, H. W., KIRK L., CRITTENDEN R., TOH, H., 1993, "*Zymomonas mobilis* - Science and Industrial Application", **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, p. 57-98.

DULY, R., HEARN, M. T. W., 2005. "Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production", **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, p. 119-138.

DUVAL, M., SUCIU, S., FERSTER, A., et al., 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**, v. 99, n.8, p. 2734-2739.

EINSFELDT, K., 2014, **Desenvolvimento de uma nova L-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* para aplicação como biofármaco**, Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

FADERL, S. et al., 2010, “Adult Acute Lymphoblastic Leukemia”, **Cancer**, v. 116, p. 1165-1176.

FERRARA, M. A., 2000, **Produção de asparaginase por *Saccharomyces cerevisiae* por expressão heteróloga do gene *ASP3* em *Pichia pastoris***. Tese de D.Sc., EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

FIOCRUZ, 2013, “Ministério da Saúde garante medicamento contra leucemia infantil”. Disponível em: <http://www.canal.fiocruz.br/destaque/index.php?id=1430>. Acesso em: 22 jul.de 2015.

FRIEHS, K., 2004, “Plasmid Copy Number and Plasmid Stability”, **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.86, p.47–82.

GUPTA, R., SHARMA, P., VYAS, V.V., 1995, “Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in *Escherichia coli*”, **Journal of Biotechnology**, v.41, p.29-37.

HONENBLUM, H. et al., 2004, “Effects of Gene Dosage, Promoters, and Substrates on Unfolded Protein Stress of Recombinant *Pichia pastoris*”, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, p. 367-375

INCA (Instituto Nacional de Câncer), 2014, “Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil”, **Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>. Acesso em: 21 de jul. de 2015.

JANA, S., DEB, J. K., 2005, “Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*”, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, p. 289-298.

KIDD, J. G., 1953, “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”, **J Exp Med**, v. 98, p. 565–582.

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

KOZAK, M. *et al.*, 2002, “Crystallization and preliminary crystallographic studies of five crystal forms of *Escherichia coli* L-asparaginase II (Asp90Glu mutant)”, **Biological Crystallography**, v. 58, p. 130-132.

KURTZBERG, 2000, “L-asparaginase”, In: **Holland-Frei Cancer Medicine**, 5 ed., Editora Hamilton (ON): BC Decker.

LI, P. *et al.*, 2007, “Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*”, **Appl Biochem Biotechnol**, v. 142, p. 105-124.

MACAULEY-PATRICK, S. *et al.*, 2005, “Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system”, **Wiley InterScience**, v. 22, p. 249-270.

MASHBURN L, WRISTON J., 1964, “Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*”, **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 105, p. 450-452.

MDIC (Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio), 2015, “Análise das Informações de Comércio Exterior (AliceWeb)”, Disponível em: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>. Acesso em: 21 de jul.de 2015.

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

NARTA, U. *et al.*, 2011, “Improved production of L-asparaginase by *Bacillus brevis* cultivated in the presence of oxygen-vectors”, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2083-2085.

OHNUMA, T. *et al.*, 1970, “Biochemical and Pharmacological Studies with Asparaginase in Man”, **Cancer Research**, v. 30, p. 2297-2305.

PAREKH, R., FORRESTER, K., WITTRUP, D., 1995, “Multicopy Overexpression of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor Saturates the Protein Folding and Secretory Capacity of *Saccharomyces cerevisiae*”, **Protein Expression and Purification**, v. 6, p. 537-545.

PASUT, G., VERONESE, F. M., 2009, “PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview”. **Advanced Drug Delivery Reviews**.v.61, p.1177–1188.

PIETERS R. *et al.*, 2011, “L-Asparaginase Treatment in Acute Lymphoblastic Leukemia: A Focus on *Erwinia* Asparaginase”, **Cancer**, v. 117, p. 238-249.

pGAPZ A, B, and C pGAPZ α A, B, and C – *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins. Catalog nos. V200-20 and V205-20. Invitrogen Life Technologies, 2002, 47p.

PINHEIRO, I. O., 2001, **Fermentações de *Zymomonas mobilis* em Meio Mínimo Usando Asparagina como Fonte de Nitrogênio**. Tese de D.Sc., COPPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

PRIELHOFER, L. *et al.*, 2013, "Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*", **Microbial Cell Factories**, v. 12.

QIN, X. *et al.*, 2011, "GAP Promoter Library for Fine-Tuning of Gene Expression in *Pichia pastoris*", **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 3600-3608.

SWAIN, A.L., JASKOLSKI, M., HOUSSET, D. *et al.*, 1993, "Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy", **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.90, p.1474-1478.

TABACCO, A., MEIATTINI, F., MODA, E., *et al.*, 1979, "Simplified Enzymic/Colorimetric Serum Urea Nitrogen Determination", **Clinical Chemistry**, v.25,n. 2, p.366-367.

THILL, G. P. *et al.*, 1990, "Positive and negative effects of multi-copy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*".In "**Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Microorganisms**", v. II, p. 477–490.

TOMA, M.M., KALNENIEKS, U., BERZINS, A. *et al.*, 2003, "The Effect of Mixing on Glucose Fermentation by *Zymomonas mobilis* Continuous Culture", **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1347-1350.

VAN DEN BERG, H., 2011, "Asparaginase revisited", **Leuk Lymphoma**, v. 52, n. 2, p. 168-78.

YUN, M *et al.*, 2007, "Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic *Escherichia coli* L-Asparaginase I", **J. Mol. Biol.** v.369, p.794–811.

ZHENG, J. *et al.*, 2014, "Screening of multi-copy mannanase recombinants of *Pichia pastoris* based on colony size", **World J Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 579-584.

ZHU, T. *et al.*, 2011, “Understanding the effect of foreign gene dosage on the physiology of *Pichia pastoris* by transcriptional analysis of key genes”, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, p. 1127-1135.