

Asparaginase [EC 3.5.1.1] de *Herbaspirillum seropedicae* HsZ₇₈

Maria Regina P. A. Tizzot
Carla R. Andrighetti Fröhner
Cristiane Gugelmin
Dicezar Gonçalves (Mestre)
João Ari Gualberto Hill (Mestre)
Paulo Guataçara da Costa Lima (Mestre)
Cristiano José da Silva
Ana Paula Borsari
Shigehiro Funayama (Doutor)

Resumo

A asparaginase (L-asparagina amidohidrolase EC 3.5.1.1) de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe 78 foi purificada a partir de extrato livre de células por fracionamento com sulfato de protamina, tratamento a 50° C, tratamento a pH 4,5 e cromatografia em coluna de Sepharose CL-6B e coluna de DEAE-Sepharose. Este procedimento produziu uma preparação enzimática bastante pura, a qual possui capacidade de hidrolisar L-asparagina e L-glutamina. O peso molecular da subunidade da enzima é aproximadamente de 30.000 daltons e o peso molecular da enzima nativa é de 120.000 daltons, determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo duodecil sulfato de sódio e por cromatografia em coluna Superdex 200 HR 10/30 da Pharmacia.

Palavras-chave: L-asparagina amidohidrolase EC 3.5.1.1; *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78; purificação.

Abstract

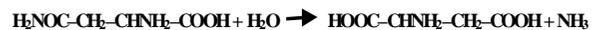
The asparaginase (L-asparagine amidohydrolase EC 3.5.1.1) from *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 was purified with protamine sulfate fractionation of free cells crude extract, heat treatment at 50° C, pH treatment at pH 4.5 and chromatography on Sepharose CL-6B column and DEAE-Sepharose column. This procedure yielded a high-purified enzyme preparation, which has ability to hydrolyze L-asparagine and L-glutamine. The molecular weight of the enzyme subunit is approximately 30,000 daltons and the molecular weight of the native enzyme is 120,000 daltons, determined by sodium duodecyl sulfate acrylamide gel electrophoresis and by chromatography on Superdex 200 HR 10/30 Pharmacia column.

Key words: L-asparagine amidohydrolase EC 3.5.1.1, *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78, Purification.

1 Introdução

Foi constatado em 1953 que o soro normal de cobaia possuía atividade anti-tumoral contra vários tipos de linfomas transplantados em ratos e camundongos (Kidd, 1953). Posteriormente, em 1963, foi demonstrado que esta atividade devia-se à presença de uma enzima, a L-asparaginase (Broome, 1963) (Broome, 1968). Entretanto, só em 1967 a L-asparaginase (L-Asnase) foi isolada em quantidade suficiente para ser submetida a testes clínicos e ter sua atividade antineoplásica comprovada (Capizzi et al., 1971). Desde então, a comunidade científica passou a demonstrar grande interesse no isolamento e purificação por este tipo de enzima. A L-asparaginase, L-asparagina amidohidrolase [EC 3.5.1.1], é uma enzima que catalisa a hidrólise do grupo amino da L-asparagina, formando ácido aspártico e amônia.

L-Asnase



Esta enzima é raramente encontrada em mamíferos e aves. Em animais como macacos, coelhos, cobaias, ratos, determinados pássaros e galinhas, a enzima localiza-se no fígado e rins. A L-asparaginase não é encontrada na espécie humana, mas é encontrada frequentemente em bactérias Gram negativas e, em menor frequência, em bactérias Gram positivas, fungos e leveduras. A L-asparaginase foi isolada de bactérias Gram negativas como *Escherichia coli* (Mashburn, & Wriston, 1964) (Campbell & Mashburn, 1969) (Whelan & Wriston, 1969) (Wriston & Yellin, 1973) (Wriston, 1985), *Bacillus coagulans* (Law & Wriston, 1971), *Serratia narcescens* (Wriston, 1971), *Proteus vulgaris* (Tosa et al., 1972), *Achromobacteriaceae* (Roberts et al., 1972), *Pseudomonas* (Roberts, 1976), *Acinetobacter glutaminasificans* (Joner, 1976), *Vibrio succinogenes* (Kafkewitz & Goodman, 1971) (Wriston, 1985), *Tetrahymena pyriformis* (Triantafillou et al., 1988), *Erwinia carotovora* (Lee et al., 1986) (Maladkar et al., 1993) e de bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* (Rozalka, 1989), *Corynebacterium glutamicum* (Mesas et al., 1990), (Sabis & Mikucki, 1991) e, de alguns fungos, como *Aspergillus sp.* (Wriston & Yellin, 1973) e *Cylindrocarpon obtusisporum* MB-10 (Raha et al., 1990) e leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* (Dunlop et al., 1978). A L-asparaginase é uma enzima constitutiva na maioria dos microrganismos citados, com exceção

no *Proteus vulgaris* (Tosa et al., 1972) e *Saccharomyces cerevisiae* (Dunlop et al., 1978). Algumas destas enzimas apresentam atividade antineoplásica, embora poucas possam ser utilizadas como quimioterápicos, fato que continua estimulando a pesquisa de novos tipos desta enzima para o enriquecimento desse recurso terapêutico.

Algumas bactérias, como a *Escherichia coli*, apresentam duas proteínas independentes com atividades de asparaginase. Uma delas está localizada no citoplasma, a asparaginase I, e a outra no espaço periplasmático, a asparaginase II, e somente a do tipo II apresenta atividade antineoplásica (Campbell et al., 1967). Testes de imunodifusão de Outchterlony mostraram que as asparaginases I e II de *Escherichia coli* são imunologicamente semelhantes e diferem imunogenicamente das asparaginases de *Erwinia carotovora* e a asparaginase II de *Escherichia coli* modificada com polietilenoglicol (Koerholz et al., 1989).

O efeito imunossupressivo da asparaginase parece estar relacionado com a atividade glutaminásica da asparaginase (Sabis et al., 1991) (47). Foi comprovado que a asparaginase de *Vibrio succinogenes*, que não possui atividade de glutaminase, também não possui atividade imunossupressiva (Wriston, 1985).

Na célula animal normal, a asparagina não é um aminoácido essencial para a manutenção da viabilidade

celular, assim, a célula supre a falta deste aminoácido através da ação da asparagina sintetase. A asparagina sintetase é uma enzima intracelular, indutível e responsável pela síntese de *novoo* da asparagina. Em níveis basais de asparagina, a síntese da asparagina sintetase não é induzida (Wriston & Yellin, 1973) (Keating *et al.*, 1993). As células neoplásicas não são capazes de induzir a síntese da asparagina sintetase e, portanto, são dependentes do nível extracelular de asparagina para realizar sua síntese protéica. Como a asparagina é retirada do meio plasmático por ação da asparaginase, as células neoplásicas, incapazes de realizar a síntese *de novo* de asparagina, entram em colapso metabólico e morrem.

A L-asparaginase mostrou-se muito útil no tratamento da leucemia linfocítica aguda, leucemia mielóide aguda e linfomas (Capizzi *et al.*, 1970) (Keating *et al.*, 1993). Testes “*in vitro*” demonstraram que o nível sanguíneo de asparagina torna-se indetectável em alguns minutos, quando a atividade da L-asparaginase é da ordem de 0,70 U/mL (Miller *et al.*, 1969) (Samuels *et al.*, 1976) (Keating *et al.*, 1993). A capacidade de reduzir substancialmente o nível plasmático de asparagina e de mantê-lo baixo por período de tempo prolongado é a característica principal, responsável pela atividade antineoplásica da asparaginase, e foi ainda demonstrado que os níveis de aminoácidos têm que

cair a níveis críticos de 0,005 mM, externamente, e no *pool* interno de 0,05 mM, para interromper a síntese de proteínas e, conseqüentemente, o crescimento celular. Em 1968 foi observado que nas células neoplásicas asparaginase-sensíveis e asparaginase-resistentes o nível de asparagina intracelular é da ordem de 0,02 mM. (Broome, 1968). Nos tratamentos com a asparaginase a taxa de regressão de tumores é bastante elevada e a redução da indução de leucemias atinge valores de 75% a 95%. Existem alguns fatores limitantes para o uso da asparaginase como quimioterápico. Um dos fatores a ser considerado é a necessidade de doses diárias de injeções parenterais de 10 a 200 U/kg/dia, por período de tempo que pode durar 21 dias. Um outro fator seria o de apresentar alguns efeitos tóxicos, como hiperglicemia, queda na albumina sérica, nas lipoproteínas e fibrinogênio, aumento de gordura no fígado e algumas disfunções cerebrais leves. O fator limitante mais importante é o desenvolvimento de hipersensibilidade ao tratamento. Isto ocorre entre 5 e 50% dos pacientes tratados. Esta hipersensibilidade vai desde pequenas reações alérgicas na área de injeção, broncospasmos e até choque anafilático, sugerindo que o paciente não deve ser submetido várias vezes a tratamentos com o mesmo tipo de asparaginase. O quadro alérgico se instala ao mesmo tempo em que se processa o chamado

“*immunoclearance*” plasmático da enzima, condições em que a asparaginase é rapidamente metabolizada, perdendo o seu efeito terapêutico (Ohmuma et al., 1970) (Keating et al., 1993).

Com o objetivo de amenizar pelo menos parte desses problemas, foram desenvolvidos experimentos de modificação estrutural e de conjugação da L asparaginase com compostos orgânicos (Ho et al., 1988) (Cao et al., 1989) (Koerholz et al., 1989) (Nerkar & Gangadharan, 1989) (Kodera et al., 1992) (Keating et al., 1993) (Ducan & Spreafico, 1994). As modificações variam desde conjugação da molécula protéica com bioplímeros, como polietilenoglicol, dextrana, albumina e heparina, ao melhoramento genético de bactérias produtoras da enzima. Com estas modificações, outras características foram adquiridas, como, por exemplo, o aumento do tempo de circulação, resistência à inativação por enzimas proteolíticas, mudança na característica da superfície, diminuindo sua capacidade antigênica, aumento na afinidade pela célula alvo e manutenção da atividade enzimática (Ducan & Spreafico, 1994). A forma de asparaginase conjugada mais conhecida para uso clínico é a do tipo II de *Escherichia coli* com polietilenoglicol (PEG), com a qual têm-se obtido excelentes resultados. A meia vida ($t_{1/2}$) do conjugado PEG-asparaginase é de mais ou menos seis dias, contra aproximadamente um dia da asparaginase nativa (Keating et al., 1993).

A descoberta de novas asparaginases com atividades antineoplásicas é de importância fundamental, principalmente se elas forem imunologicamente diferentes daquelas até então estudadas.

Neste trabalho, o *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78, bactéria fixadora de nitrogênio, foi utilizado como fonte de asparaginase. Esta bactéria foi escolhida por não ser patogênica, estar disponível em nosso laboratório e ter sua condição de cultivo bem determinada. A estirpe de escolha foi a Z78 devido ao fato de ela apresentar maior teor de asparaginase dentre as bactérias fixadoras de nitrogênio testadas. O *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 é uma bactéria diazotrófica, isto é, capaz de utilizar o N_2 atmosférico como única fonte de nitrogênio e transformá-lo em amônia (Benemann & Valentine, 1972). Este microorganismo pode existir sob forma de vida livre e associada à rizosfera e na superfície de gramíneas forrageiras, como sorgo, folhas de arroz e de cana-de-açúcar, e também em raízes de plantas daninhas (Baldani et al., 1986). É uma bactéria Gram negativa, aeróbica, apresenta-se sob a forma vibrióide, com diâmetro de 0,6 a 0,7 μ m e tamanho variando de 1,5 a 5 μ m dependendo do meio em que é cultivada. É móvel, possuindo de um a três flagelos em um ou ambos os pólos (Baldani et al., 1986).

2 Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Os reagentes acrilamida, agarose, albumina bovina, L-asparagina, ácido L e D aspártico, ácido L-glutâmico, aspartil b-hidroxamato, ácido nalidíxico, azul de Coomassie Brilhante G-250 e R-250, bisacrilamida, Temed (N, N, N', N'-tetrametilenodiamina), L-glutamina, hidroxilamina, sulfato de protamina, glutamato monossódico foram obtidos da Sigma Chemical Company. O sulfato de amônio foi obtido da Merck; o 2-mercaptoetanol foi obtido da Ridel; a Sepharose CL-6B e a DEAE-sepharose foram obtidos da Pharmacia Fine Chemical. Os demais reagentes utilizados neste trabalho foram obtidos comercialmente de diversas fontes, rotulados como produtos com grau de pureza pró-análise ou quimicamente puros.

2.2 Microorganismo

A cepa de *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe Z78, foi gentilmente cedida pelo Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

2.3 Meio de Cultura e Condições de Cultivo

O *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 foi cultivado em meio de cultura líquido NFbHP (Pedrosa & Yates, 1984). O meio foi suplementado com glutamato de sódio 8 mM como fonte de nitrogênio e adicionado de ácido nalidíxico (Nal) a 10 mg/mL do meio de cultura. As culturas foram incubadas em agitador rotatório, "shaker", ajustado a 120 rpm e a temperatura de 28° C por período de 16 a 17 horas. A cultura em grande escala do *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 foi realizada em frascos erlernmeyer de 2000 mL contendo 400 mL do meio NFbHPG-Nal¹⁰.

2.4 Extrato Bruto Livre de Células

O rompimento das células de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 para obtenção do extrato bruto livre de células foi realizado em prensa francesa tipo "French Press". A pressão utilizada foi de 900 a 1000 psi, que permitiu a extração de 24,4 mg de proteínas por mL, usando Tris/HCl 0,1 M pH 8,0, contendo 1 mM de mercaptoetanol na proporção de 1:3 (p:v) como tampão de extração.

2.5 Métodos Analíticos

2.5.1 Dosagem da atividade enzimática

Para dosagem da atividade enzimática da asparaginase foram utilizados os métodos de nesslerização (Wriston, 1971) e o método do aspartil b-hidroxamato (Mesas et al., 1990) com algumas modificações.

2.5.1.1 Método de nesslerização

Um mL do sistema de incubação contendo asparagina 0,02M em Tris/HCl 0,05M, pH 8,0 e uma quantidade de enzima apropriada foram incubados a 37°C por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,125 mL de ácido tricloroacético (TCA) 15%. A mistura foi centrifugada em centrífuga Spin a 9000 rpm por 2 a 3 minutos e uma alíquota de 0,5 mL foi retirada, diluída com 2,25 mL de água destilada e adicionados 0,25 mL do reativo de Nessler. Esta solução foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura da absorbância em 425 nm ou 500 nm. A quantidade de amônia produzida na mistura de incubação foi determinada a partir de uma curva de calibração usando sulfato de amônio como padrão.

2.5.1.2 Método do aspartil b-hidroxamato

Um mL da mistura de reação contendo asparagina 0,02 M, hidroxilamina 0,4M neutralizada e uma quantidade apropriada de enzima em tampão Tris/HCl 0,05 M pH 8 foi incubado a 37° C, por 20 minutos. Após este período de tempo, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de uma mistura cromogênica (FeCl₃ 100g, ácido tricloroacético 33g em 1 litro de HCl 0,7 M). Esta solução foi então centrifugada a 9000 rpm por 10 minutos. A quantidade de aspartil b-hidroxamato produzida foi quantificada espectrofotometricamente a 515 nm.

Uma unidade de asparaginase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 mmol de ácido aspártico por minuto sob as condições padrões de medida da atividade enzimática e a atividade específica como a razão entre unidades de enzima por miligrama de proteína.

2.6 Determinação da concentração de proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas utilizando-se o reagente de Folin-fenol (Lowry et al., 1951), tendo albumina bovina como padrão.

2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

As eletroforeses em gel de poliacrilamida foram realizadas na presença de SDS (Laemmli, 1970). Os marcadores de peso molecular utilizados foram: anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (45 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), fosforilase B (70 kDa), b-galactosidase (116 kDa) e miosina (205 kDa). As bandas protéicas foram visualizadas após a coloração do gel com Coomassie Brilhante G-250 (Blakesley & Boezi, 1977).

2.8 Cromatografia em Coluna de Sepharose CL-6B

A preparação enzimática obtida por fracionamento a pH 4,5 foi concentrada por ultrafiltração e cerca de 4 mL desta preparação foram cromatografados em coluna de Sepharose CL-6B (coluna Pharmacia XK 16/70) previamente equilibrada com tampão Tris/HCl 0,1 M pH 8,6 contendo 0,02 M de NaCl. Esta coluna foi acoplada ao aparelho de cromatografia líquida de alta resolução (FPLC) e calibrada para operar a pressão de 0,1 a 0,3 megapascal e com fluxo de 1 mL/minuto. O volume total desta coluna (V_t) foi de 130,6 mL. O volume morto (V_0), determinado

com uso de azul de dextrana 2000, foi de 40 mL. Para a eluição cromatográfica foi utilizado tampão Tris/HCl 0,05 M pH 8,6 contendo 20 mM de NaCl. As frações protéicas foram eluídas em um volume total de 225 mL, a atividade de asparaginase monitorada pelo método de aspartil b-hidroxamato e a concentração de proteínas pela absorção a 280 nm. As frações contendo atividade enzimática entre 1,5 a 11,6 U/mL foram juntadas (85 mL) e submetidas a ultrafiltração até o volume ser reduzido a 9 mL. Essa preparação foi dialisada contra 2 litros de tampão Bicina 10 mM pH 8,9 contendo 1 mM de mercaptoetanol, por 12 horas.

2.9 Cromatografia em Coluna de DEAE-Sepharose

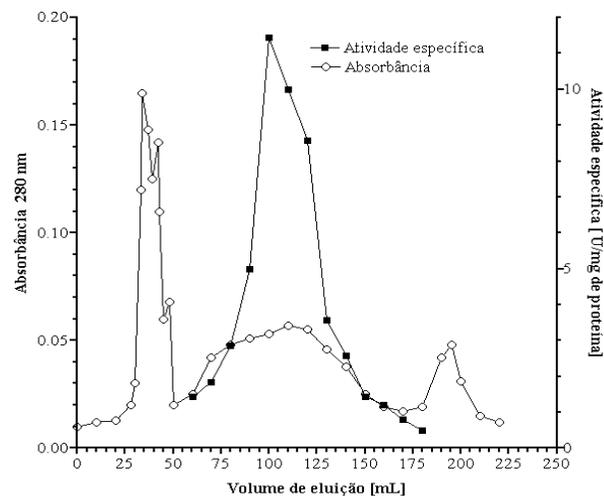
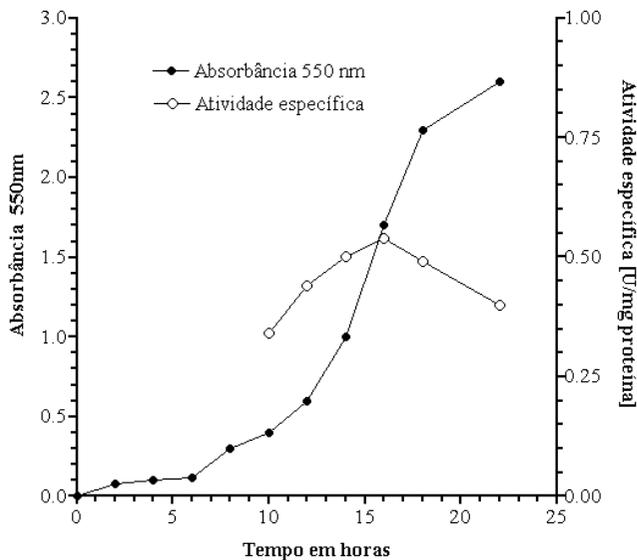
O dialisado obtido na etapa anterior foi cromatografado em coluna de DEAE-Sepharose "Fast flow" XK 26/40 da Pharmacia, previamente equilibrada com tampão Bicina 10 mM pH 8,9 contendo 1 mM de mercaptoetanol e com volume total (V_t) de 186 mL. A coluna foi acoplada ao aparelho de FPLC calibrado para operar a pressão de 0,2 a 0,4 megapascal e com um fluxo de 1 mL por minuto. As frações protéicas foram eluídas em gradiente de NaCl de 0 a 750 mM, em tampão Bicina 10 mM pH 8,9

contendo 1 mM de mercaptoetanol. A atividade de asparaginase foi monitorada pelo método do aspartil b-hidroxamato e as proteínas pela absorbância a 280 nm. As frações com atividade enzimática foram juntadas (21 mL), concentradas por ultrafiltração (3,5 mL), separadas em alíquotas e

Figura 2 - Perfil de eluição da cromatografia em coluna de Sepharose CL-6B da preparação de asparaginase obtida por fracionamento a pH 4,5.

A preparação enzimática obtida por fracionamento a pH 4,5 foi concentrada por ultrafiltração. Cerca de 4 mL da preparação concentrada foram cromatografados em coluna de Sepharose CL-6B e as proteínas eluídas com tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,5, contendo 20 mM de NaCl.

Figura 1 - Produção de asparaginase em função da idade da cultura. A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 foi cultivada em meio NFbHPG-NaI¹⁰ sob as condições descritas em Materiais e Métodos. Nos tempos indicados na figura, alíquotas de 100 mL foram coletadas e utilizadas para determinação da absorbância da cultura, atividade enzimática e da concentração de proteínas.



estocadas a -20° . Nestas condições a atividade de asparaginase se mantém estável por pelo menos 3 meses.

Figura 3 - Perfil de eluição da cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose da preparação de asparaginase obtida por cromatografia em coluna de Sepharose CL-6B.

A preparação enzimática obtida por cromatografia em coluna de Sepharose CL-6B foi concentrada por ultrafiltração. Cerca de 9 mL da preparação concentrada foram cromatografados em coluna de DEAE-Sepharose. As proteínas foram eluídas com gradiente de NaCl de 0 a 0,75 M em tampão Bicina 0,01M, pH 8,9.

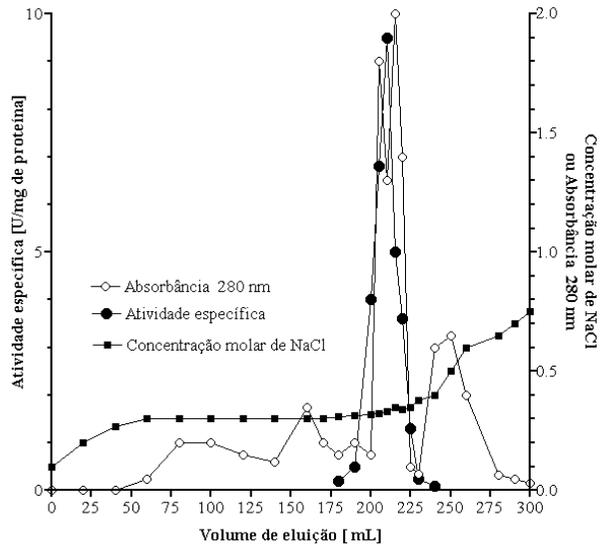


Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada na presença de SDS (Laemmli, 1970). As linhas de 1 a 6 (da esquerda para direita) ilustram respectivamente o conteúdo protéico das frações de extrato bruto livre de células, sobrenadante após tratamento com sulfato de protamina, sobrenadante após tratamento térmico a 50° C, sobrenadante após tratamento a pH 4, 5, concentrado das frações ativas obtidas por cromatografia em coluna de Sepharose CL-6B e concentrado das frações ativas obtidas por cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose. A linha 7 mostra o comportamento dos marcadores de peso molecular (em ordem ascendente): anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (45 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), fosforilase B (70 kDa), b-galactosidase (116 kDa) e miosina (205 kDa). As bandas protéicas foram visualizadas após a coloração do gel com Coomassie Brilhante G-250 (Blakesley & Boezi, 1977).

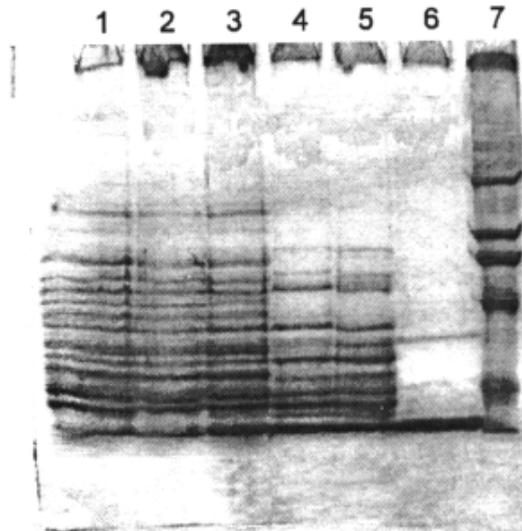


Tabela de purificação da asparaginase de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78

Fração	Volume total (ml)	Proteína total (mg)	Unidades totais (U)	Atividade específica U/mg de proteína	Rendimento (%)	Purificação
Extrato Bruto	42,0	1.024,8	394,8	0,38	100,0	-
Tratamento com 0,3 volumes de Sulfato de protamina a 1%	49,0	857,0	333,2	0,39	84,4	1,0
Tratamento térmico 50°C	47,0	626,7	305,0	0,49	77,2	1,3
Tratamento em pH 4,5	45,0	243,0	372,0	1,12	68,9	2,9
Cromatografia em coluna de Sepharose CL6-B	84,0	107,4	227,1	2,11	57,5	10,4
Cromatografia em coluna de DEAE – Sepharose	21,0	44,7	206,0	4,60	52,0	12,0

2.10 Determinação do Peso Molecular da Asparaginase por Cromatografia em Coluna

Cerca de 100 mL de uma solução, contendo 0,40 mg de uma mistura de proteínas constituídas por marcadores moleculares (tiroglobulina 669 kDa, ferritina 440 kDa, IgG humana 150kDa, transferrina humana 81 kDa, ovalbumina 43 kDa e miosina 17,6 kDa) e asparaginase foram cromatografados em coluna de Superdex 200 HR 10/30 acoplada a um aparelho de FPLC calibrado para operar a pressão de 0,2 a 0,4

megapascal e com fluxo de 0,25 mL por minuto. As frações protéicas foram eluídas com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 contendo 20 mM de NaCl. Com os registros gráficos fornecidos pelo FPLC foi possível determinar o PM da asparaginase.

3 Resultados e Discussão

A figura 1 mostra o crescimento do *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 no meio NFbHPG-Nal¹⁰ e a variação de atividade específica da asparaginase na

bactéria com a idade da cultura bacteriana. O crescimento máximo é atingido em 22 horas de incubação, enquanto que a atividade específica aumenta de 0,35 para 0,55 U/mg no período compreendido entre 10 e 16 horas de incubação. Após as 16 horas, mesmo obtendo um maior rendimento em gramas de células, a atividade específica decresce até o nível de 0,40 U/mg nas 6 horas seguintes. Desde que as células se mostraram intactas à análise microscópica, é bem provável que a partir do tempo em que a fonte de carbono tenha sido exaurida, a síntese da asparaginase tenha cessado e surpreendentemente o crescimento celular ocorreu ainda por mais um espaço de tempo com diluição da enzima. O uso de lactato e ou asparagina em concentrações de 80 mM no meio de cultura de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 acarreta maior produção de asparaginase, podendo a atividade específica chegar ao nível máximo de 0,65 U/mg. Este resultado, entretanto, não foi considerado compensador, tendo em vista o gasto de 10 vezes mais glutamato. Este tipo de comportamento foi também observado em estudos realizados com asparaginase de *Escherichia coli* (Campbell & Mashburn, 1969) e *Vibrioproteus indian* (Ohmuma *et al.*, 1970).

A tabela sumariza o método de purificação da asparaginase de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78. O rompimento das células de *Herbaspirillum seropedicae*

estirpe Z78 para obtenção do extrato bruto livre de células foi realizado em prensa francesa tipo “French Press”. A pressão utilizada foi de 900 a 1000 psi, que permitiu a extração de 24,4 mg de proteínas por mL, usando Tris/HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 1 mM de mercaptoetanol na proporção de 1:3 (p:v) como tampão de extração. A atividade específica deste extrato foi de 1,5 a 2 vezes maior que a obtida em outros métodos testados, como o uso de abrasivo ou ultrassom. O fracionamento com 0,3 volumes de sulfato de protamina a 1%, em relação ao volume inicial do extrato bruto livre de células, permitiu a eliminação de ácidos nucléicos e fragmentos celulares sem perda significativa da atividade enzimática. Acima destes volumes, ocorreu perda da atividade enzimática e, em volumes menores, a precipitação de nucleoproteínas não foi satisfatória uma vez que não houve aumento da atividade específica.

Com o estudo da estabilidade da asparaginase frente à temperatura foi verificado que a enzima na presença do substrato é resistente à temperatura de 60°C por 5 minutos. No entanto, na ausência do substrato, ela perde quase que a totalidade de sua atividade quando submetida à temperatura de 50°C por mais de 1 minuto (dados não mostrados). Estes resultados possibilitaram a idealização de uma etapa de purificação, o tratamento térmico da fração sulfato de protamina

na presença de substrato. Este tratamento provocou a precipitação de cerca de 25% das proteínas totais da etapa anterior, mantendo 91,5% da atividade enzimática. Certas asparaginases, como a da *Escherichia coli* (Campbell & Mashburn, 1969), *Bacillus coagulans* (Law & Wriston, 1971), *Pseudomonas 7A* (Roberts, 1976), *Erwinia carotovora* (Maladkar et al., 1993) mostraram-se estáveis à temperatura de 50 a 55°C por alguns minutos; outras, como a de *Staphylococcus* (Sabis & Mikuki, 1991), *Proteus vulgaris* (Tosa et al., 1972), *Acinetobacter calcoaceticus* (Joner, 1976) e *Citrobacter* (Bascomb et al., 1975), quando na presença de asparagina, resistem a temperaturas de até 55°C. O comportamento da asparaginase de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 frente à temperatura é bastante similar a estas asparaginases.

A desproteínização da preparação enzimática, obtida por tratamento térmico com abaixamento do pH a 4,5, mostrou-se bastante eficiente, levando a uma diminuição da concentração de proteínas de cerca de 60% em relação à concentração de proteínas totais da fração anterior. Não se observou perda significativa nas unidades de enzima, o que conseqüentemente acarreta um aumento da atividade específica de 2,3 vezes em relação à etapa anterior. A asparaginase de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78, analogamente à asparaginase II de *Escherichia coli* (Campbell &

Mashburn, 1969) e de *Staphylococcus* (Sabis & Mikuki, 1991), é resistente a baixos valores de pH, razão pela qual esta característica foi utilizada como mais um recurso de purificação. A fração obtida no tratamento com pH 4, 5 foi concentrada por ultrafiltração até o volume final de 4 mL e submetida à cromatografia em coluna de Sepharose CL-6B.

No perfil cromatográfico da figura 2 pode-se localizar o pico da asparaginase entre os volumes de eluição de 60 a 180 mL. As frações ativas com atividade específica igual ou superior a 1,5 U/mg foram juntadas, resultando num volume final de 84 mL e com atividade específica de 2,11 U/mg. Esta preparação enzimática foi concentrada por ultrafiltração até o volume final de 9 mL, dialisada contra tampão Bicina 10 mM pH 8, 9, contendo 1 mM de mercaptoetanol e posteriormente submetida à cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose.

A figura 3 mostra o perfil cromatográfico onde se pode observar que a asparaginase é eluída nas concentrações de 300 a 350 mM de NaCl e em volumes de eluição entre 180 a 230 mL. As frações ativas com atividade específica igual ou superior a 1,5 U/mg foram recuperadas num volume total de 21 mL. Essa preparação foi submetida à ultrafiltração até o volume final de 3,5 mL e estocada a -70°C em alíquotas de 0,3 mL. Nestas condições, a asparaginase manteve-se estável

por pelo menos 3 meses. Este processo de purificação permitiu a obtenção de uma preparação de asparaginase com grau de purificação da ordem de 12 vezes e um rendimento de 52%.

A figura 4 mostra o perfil eletroforético das frações enzimáticas das etapas de purificação da asparaginase. As linhas 1 a 5 correspondem às frações das etapas de purificação; mostram grandes números de proteínas contaminantes e o enriquecimento gradual da banda protéica de asparaginase. Na linha 6, pode-se observar melhor o grau de enriquecimento da banda correspondente à asparaginase. Podemos observar ainda o comportamento eletroforético dos padrões de proteínas na linha 7. Com os dados obtidos a partir deste eletroforetograma, é possível construir um gráfico que permite estimar um peso molecular de 30.000 daltons para cada subunidade da asparaginase de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78. Um peso molecular de 120.000 daltons foi estimado para a enzima nativa usando dados obtidos na cromatografia em coluna Superdex 200 HR 10/30, descrita em Materiais e Métodos. Neste aspecto, a asparaginase de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 é semelhante à de *Escherichia coli* (Campbell & Mashburn, 1969) (Lee et al., 1986) (Tosa et al., 1972), que possui também PM de 120.000 daltons. O peso molecular para a maioria das L-Asnases está na faixa de 100.000

a 150.000 daltons, com algumas exceções como as de *Cylindrocarpon obtusisporum* MB-10 (Raha et al., 1990) com PM de 216.000 daltons, e *Saccharomyces cerevisiae* (Dunlop et al., 1978) com PM de 400.000 e a de *Corynebacterium glutamicum* (Mesas et al., 1990) com PM de 80.000 daltons.

As L-Asnases até então estudadas e citadas na literatura especializada possuem na sua maioria quatro subunidades idênticas. As subunidades estão ligadas duas a duas por ligação não covalente, com dois sítios de ligação por cada dímero. As subunidades isoladas são inativas e apresentam PM entre 24.000 e 40.000 daltons (Whelan & Wriston, 1969) (Wriston, 1971) (Bascomb et al., 1975) (Joner, 1976) (Koerholz et al., 1989). A faixa de pH ótimo das L-Asnases varia de 6,5 a 9,0 e a temperatura ótima para atividade varia de 30 a 55°C (Campbell et al., 1967) (Wriston, 1971) (Roberts et al., 1972) (Tosa et al., 1972) (Bascomb et al., 1975) (Roberts, 1976) (Wriston, 1985) (Mesas et al., 1990) (Raha et al., 1990) (Sabis & Mikuki, 1991) (Law & (Maladkar et al., 1993). A asparaginase de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 apresenta pH ótimo de 8,5 diferenciando-se das asparaginases de *Proteus vulgaris* (Tosa et al., 1972), *Achromobacteraceae* (Bascomb et al., 1975), *Erwinia carotovora* (Lee et al., 1986), *Cylindrocarpon obtusisporum* (Raha et al., 1990) e tipo II de *Escherichia*

coli (Campbell et al., 1967), que apresentam valores de pH ótimo entre 7 e 8.

As asparaginases apresentam diferentes valores de afinidade pelo seu substrato, a asparagina. As L-Asnases isoladas de *Escherichia coli*-B (Campbell et al., 1967), *Vibrio succinogenes* (Kafkewitz & Goodman, 1971), *Erwinia carotovora* (Lee et al., 1989), *Vibrioproteus indians* (Sinhá et al., 1991) apresentam valores de Km na ordem de 10 mM, a de *Escherichia coli* (Wriston, 1971), *Cylindrocarpon obtusisporum* (Raha et al., 1990), *Corynebacterium glutamicum* (Mesas et al., 1990) valores de Km na ordem de 1 mM e as do gênero *Staphylococcus* na ordem de 10 mM (Sabis & Mikuki, 1991). Uma das características mais importantes para a utilização deste tipo de enzima como quimioterápico, é o fato de a L-Asnase em questão apresentar baixo valor de Km. Estudos mais recentes têm demonstrado que a meia vida ($t_{1/2}$) plasmática da enzima talvez seja o melhor parâmetro para se determinar a eficiência antineoplásica da asparaginase (Capizzi et al., 1971) (Wriston & Yellin, 1973) (Wriston, 1985) (Sabis et al., 1991).

O comportamento cinético da asparaginase de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 frente a diferentes concentrações de L-asparagina e L-glutamina é do tipo sigmoidal, portanto, não michaeliano. Por este motivo,

não foi determinado o valor de Km pelo método gráfico de Lineweaver–Burk. Os $S_{0,5}$ da asparaginase para os dois substratos foram determinados utilizando-se a equação de Hill. Os valores de $S_{0,5}$ da asparaginase foram em torno de 1,9 mM para L-asparagina e 1,65 mM para L-glutamina. Os valores de n para ambos os casos foram de 2, sugerindo a existência de dois sítios de ligação do substrato na enzima. Este tipo de comportamento é análogo ao encontrado em asparaginase do tipo I de *Saccharomyces cerevisiae* (Dunlop et al., 1978). As asparaginases de *Vibrio succinogenes* (Kafkewitz & Goodman, 1971), asparaginase I de *Escherichia coli*, (Wriston, 1985) *Cylindrocarpon obtusisporum* (Raha et al., 1990) e de *Corynebacterium glutamicum* (Mesas et al., 1990) possuem atividade de asparaginase exclusivamente. A asparaginase de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 é bioquimicamente semelhante às asparaginases de *Achromobacteriaceae* (Roberts et al., 1972), *Proteus vulgaris* (Tosa et al., 1972) e *Pseudomonas 7 A* (Roberts, 1976), uma vez que todas apresentam atividades de asparaginase e glutaminase. A percentagem da atividade de glutaminase em relação à atividade de asparaginase varia de 2% a 50% respectivamente, em *Escherichia coli* e *Pseudomonas 7 A* (Campbell et al., 1967) (Roberts, 1976).

Referências bibliográficas

- BALDANI, J. I; BALDANI, V.L.D; SELDINI, L; DOBEREINER, J. (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen.nov, sp. Nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. *Int. J.Syst.Bacteriol*, Washington, v.36, p. 86-93.
- BASCOMB, B.; BANKS, G.T.; SKARSTEDT, H.T.; FLEMING, A.; BETTLEHEIN, K.A.; CONNORS, T.A. (1975). The properties and large-scale production of L/Asparaginase from *Citrobacter*. *J. Gen. Microbiol*, v.91, p. 1-16.
- BENEMANN, J.R. & VALENTINE, R.C. (1972). The pathways of nitrogen fixation. *Adv. Microbiol. Phisiol*, California, v.8, p. 59-104.
- BLAKESLEY, R.W; BOEZI, J.A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G 250. *Anal. Biochem*, v.82, p. 580-582.
- BROOME, J.D. (1963). Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its ant lymphoma effects. *J. Exp. Med.*, v.118, p. 99.
- BROOME, J.D. (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: difference in asparagine formation and utilization in asparaginase-sensitive and resistant lymphoma cells. *J.Exp. Med.*, v.127, p. 1055-1072.
- CAMPBELL, H.A.; MASHBURN, L.T. (1969). L-asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*: some substrate specificity characteristics. *Biochemistry*, v.8, p. 3768-3775.
- CAMPBELL, M.A.; MASHBURN, L.T.; BOYSE, E.A.; OLD, L.J. (1967). Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. Their separation, purification and ant tumor activity. *Biochemistry*, v.6, p. 721-730.
- CAO, S.G.; ZHAO, Q.; DING, Z.T.; MA, L.; YU, T.; WANG, J.H.; FUNG, Y.; CHENG, Y.H. (1989). Chemical modification of enzyme molecules to improve their characteristics. *Ann. N.Y. Academic of Science*, v.6, p. 460-467.
- APIZZI, R.L.; BERTINO, J.R.; HANDSCHUMACHER, R.E. (1970). L-asparaginase *Ann. Rev. Med*, v.21, p. 433.
- CAPIZZI, R.L.; BERTINO, J.R.; SKEEL, R.T., CREASEY, W.A.; ZANES, R.; OLAYON, C.; PETERSON, R.G.; HANDSCHUMACHER, R.E. (1971). L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological and immunological studies. *Ann. Intern. Med.*, v.74, p. 893.

- DUCAN, R.; SPREAFICO, F. (1994). Polymer conjugates-Pharmacokinetic considerations for design and development. *Clin. Pharmacokinet*, v.27, p. 4.
- DUNLOP, P.C.; MEYER, G.M.; BAN, D.; ROON, R.J. (1978). Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem*, v.253, p. 1297-1304.
- HASKELL, C.M; CANELLOS, G.P.; LEVENTHAL, B.G.; CARBONE, P.P.; BLACK, J.B. (1969). L.-asparaginase resistance in human leukemia-asparaginase synthetase. *Biochem. Pharmacol*, v.18, p. 2578.
- HILL, J. M.; ROBERTS, S., LOEB, E.; KHAN, A.; MACLELLAN, A.; HILL, R.B. (1967). L- asparaginase therapy for leukemia. *J.A.M.A.*, v.202, p. 882.
- HO, D.H.; WANG, C.Y.; LIN, J.R.; BROWN, N.; NEWMAN, R.A.; KRAKOFF, I.H. (1988). PEG L-asparaginase studies in rabbits. *Drug Metab. Dispos.*, v.16, p. 27-29.
- JONER, P.E. (1976). Purification and Properties of L-Asparaginase B from *Acinetobacter colcoacticus*. *Biochim. Biophys. Acta*, v.438, p. 287-295.
- KAFKEWITZ, D. & GOODMAN, D. (1971). L-asparaginase production by rumen anaerobe *Vibrio succinogenes*. *Appl. Microbiol*, v.27, p. 206-209.
- KEATING, J.M.; HOLMES, R.; LERNER, S.; HO, S.H.W. (1993). L-asparaginase and PEG asparaginase, past, present and future. *Leuk. Lymphoma*, v.10, p. 153.
- KIDD, J.G. (1953). Regression of transplanted lymphomas induced *in vivo* by means of normal guinea pig serum. *J. Exp. Med.*, v.98, p. 565.
- KODERA, Y; TANAKA, H.; MATSUSHIMA, A.; INADA, Y. (1992). Chemical modifications of L-asnase with a comb-shaped copolymer of PEG derivative and maleic anhydride. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v.184, p. 144-148.
- KOERHOLZ, D.; BRUECK, M.; NUENBERGER, W.; JUERGENS, H.; GOEBEL, V.; WAHN, V. (1989). Chemical and immunological characteristics of four different L-asparaginase preparations. *Eur. J. Haematol*, v.42, p. 417-424.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p. 680-685.

- LAW, A.S.; WRISTON, J.C.JR. (1971). Purification and Properties of *Bacillus coagulans* L-Asparaginase. Arch. Biochem. Biophys, v.147, p. 744-752.
- LEE, S.M.; ROSS, J.T.; GUSTAFSON, M.E.; WROBLE, M.H.; MUSCHIK, G.M. (1986). Large scale recovery and purification of L-asparaginase from *E. carotovora*. Appl. Biochem. Biotechnol, v.12, p. 229-247.
- LEE, S.M.; WROBLE, M.H.; ROSS, J. T. (1989). L-asparaginase from *E. carotovora*. An improved recovery and purification using affinity chromatography. Appl. Biochem. Biotechnol, v.22, p. 1-11.
- LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., v.193, p. 265.
- MALADKAR, N.K.; SINGH, V.K.; NAIRK, S.R. (1993). Fermentative production and isolation of L- asparaginase from *E. carotovora* EC-113. Hindustan Antibiot. Bull, v.35, p. 77-86.
- MASHBURN, L.T.; WRISTON, Jr., J.C. (1964). Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys, v.105, p. 450.
- MESAS, J. M.; GIL, J.A.; MARTIN, J.F. (1990). Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. Gen. Microbiol, v.136, p. 515-519.
- MILLER, H.K.; SALSER, J.S.; BALIS, M.E. (1969). Amino acid levels following L-asparaginase amidohydrolase, E.C. 3.5.1.1 therapy. Cancer Res., v.29, p.183.
- NERKAR, D. P; GANGADHARAN, M. (1989). Modifications of L-asparaginase from *E. carotovora* using human serum albumin. Mol. Biotherapy, v.1, p. 152-154.
- OHMUMA, T., HOLLAND, J.F., FREEMAN, A.; SINKS, L.F. (1970). Biochemical and Pharmacological Studies with Asparaginase in Man. Cancer Res., v.30, p. 2297-2305.
- PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. (1984). Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasiliense* by *nif* A and *ntr* (*gln*) type gene products. Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Sett, Amsterdam, v.23, p. 95-101.
- RAHA, S.K.; ROY, S.K.; DEY, S.K.; CHAKRABOUTY, S.L. (1990). Purification and properties of an L-asparaginase from *Cylindrocarpon* MB-10. Biochem. Inter., v.21, p.977-1000.

- ROBERTS, J. (1976). Purification and properties of a high potent ant tumor glutaminase-asparaginase from *Pseudomonas* 7 A. J. Biol. Chem., v.251, p. 2119-2123.
- ROBERTS, J.; KOLENBERG, J.S.; DOLOWY, W.C. (1972). Isolation, purification and properties of *Achromobacteriaceae* glutaminase-asparaginase with ant tumor activity. J.Biol.Chem, v. 247, p. 84-90.
- ROZALKA, M. (1989). *Staphylococcal* L-asparaginase: purification and properties of enzymic protein. Acta Microbiol. Pol., v.38, p. 233-245.
- SABIS, M.; MIKUCKI, J. (1991). *Staphylococcal* L-asparaginase: enzyme kinetics. Acta Microbiol. Pol., v.40, p. 143-152.
- SABIS, M.; MIKUCKI, J.; LISIECKI, P. (1991). *Staphylococcal* L-asparaginase: ant lymphoma and immune-suppressive action. Acta Microbiol. Pol, v.40, p. 137-421.
- SAMUELS, B.I.; CULBERT, S.J.; OKAMURA, J. (1976). Early detection of chemotherapy related pancreatic enlargement in children using abdominal sonography. Cancer Res., v.38, p. 1976.
- SINHA, A.; MANNA, S.; ROY, S.K.; CHAKRABARTY, S.L. (1991). Induction of L-asparaginase synthesis in *Vibrioproteus Indian*. J. Med. Res, v.93, p. 289-292.
- TOSA, T.; SANO, R.; YAMAMOTO, K.; NAKAMURA, M.; CHIBATA, I. (1972). L-asparaginase from *Proteus vulgaris*. Purification, crystallization and enzymes properties. Biochemistry, v.11, p. 217.
- TRIANAFILLOU, D.J.; GEOGATSOS, J.G.; KYRIAKIDIS, D.A. (1988). Purification and properties of L-asparaginase *Tetrahymena pyriformis*. Mol. Cell. Biochem, v.81, p. 43-51.
- WHELAN, H.A.; WRISTON, J.C. Jr. (1969). Purification and properties of asparaginase from *Escherichia coli*. Biochemistry, v.8, p. 6.
- WRISTON, J.C.; YELLIN, T.O. (1973). L-asparaginase a review. Adv. Enzymol, New York, v.39, p. 185-248.
- WRISTON, J.C.Jr. (1971). Asparaginase, In: Methods in Enzymology, New York, v.17A: 732-742.
- WRISTON, J.C.Jr. (1985). Asparaginase, In: Methods in Enzymology, New York, v.113, p.