

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y  
Bionanotecnología**

---

**Estudio *in silico* de L-asparaginasa de *Streptomyces* para la  
identificación de potenciales candidatas para el tratamiento  
de la Leucemia Linfocítica Aguda**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Iván González Torres**

Ensenada, Baja California, México

2018

Tesis defendida por

**Iván González Torres**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Alejandro Huerta Saquero**

Director de tesis

Miembros del comité

**Dr. Ernesto Pérez Rueda**

**Dra. María Asunción Lago Lestón**

**Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez**



---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la  
Vida

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Iván González Torres © 2018*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta Iván González Torres como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

**Estudio *in silico* de L-asparaginasas de *Streptomyces* para la identificación de potenciales candidatas para el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Aguda**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Alejandro Huerta Saquero

**Director de tesis**

La L-asparaginasa tipo II de *Escherichia coli* es una enzima esencial en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda. Tras su administración, el nivel de L-asparagina en el torrente sanguíneo se reduce y conduce a la apoptosis de los linfoblastos leucémicos debido a que son incapaces de sintetizar el aminoácido. Sin embargo, la alta inmunogenicidad de la enzima es la principal limitante para su uso y, aunada a su actividad L-glutaminasa, disminuye la eficacia del tratamiento. En este trabajo se identificaron, seleccionaron y caracterizaron L-asparaginasas de microorganismos del género *Streptomyces* con base en análisis bioinformáticos de su secuencia de aminoácidos, su perfil inmunogénico, modelado por homología y su afinidad por la L-asparagina. Finalmente, se propuso un modelo estructural y dos posibles sitios activos para una L-asparaginasa de *Streptomyces scabrissporus*, no caracterizada y que forma parte de una familia de proteínas poco estudiada. La baja inmunogenicidad y buena afinidad por la asparagina de la L-asparaginasa de *Streptomyces scabrissporus* predicha, permite proponerla como alternativa para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda.

**Palabras clave: L-asparaginasa, *Streptomyces*, inmunogenicidad**

Abstract of the thesis presented by Iván González Torres as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

**Bioinformatic study of L-asparaginases from *Streptomyces* to identify potential candidates for the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia**

Abstract approved by:

---

Dr. Alejandro Huerta Saquero

Thesis Director

The enzyme L-asparaginase from *Escherichia coli* is a therapeutic enzyme that has been a cornerstone in the clinical treatment of acute lymphoblastic leukemia for the last decades. However, treatment effectiveness is limited by the highly immunogenic nature of the protein and its dual-substrate activity towards L-glutamine. In this work, a bioinformatic approach was used to identify, select and characterize L-asparaginases from *Streptomyces* through sequence-based screening analyses, immunoinformatics, homology modeling and molecular docking studies. Furthermore, two putative binding sites and a 3D model were proposed for a previously uncharacterized L-asparaginase from *Streptomyces scabrisporus*. The predicted low immunogenicity and good affinity for asparagine of L-asparaginase from *Streptomyces scabrisporus* allows us to propose it as an alternative for the treatment of acute lymphocytic leukemia.

**Key words:** L-asparaginase, Immunogenicity, *Streptomyces*,

## **Dedicatoria**

*A mis padres, por todo...*

## Agradecimientos

Al Dr. Alejandro Huerta, por la guía, apoyo y libertad que me dio para realizar este trabajo de tesis.

Al Dr. Ernesto Pérez, por su ayuda para entender aspectos fundamentales de este trabajo y por todo el apoyo brindado.

Al Dr. Zahaed Evangelista, por las enseñanzas que hicieron posible esta tesis.

A la Dra. Asunción Lago y el Dr. Carlos Brizuela, por todas las preguntas y la discusión que enriquecieron enormemente esta tesis.

Al Dr. Andrés Zárate y la I.B.Q. Cristina Díaz-Barriga, por sus valiosas aportaciones, discusión y apoyo en la parte experimental de este trabajo.

A la Dra. Katrin Quester y M. en C. Itandehui Betanzo, por su excelente trabajo, que hace posible el desarrollo experimental en el laboratorio de Bionanotecnología.

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada** por el gran apoyo para realizar el posgrado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por el apoyo para cursar el posgrado. Número de becario 769179.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN210618.

# Tabla de contenido

---

Resumen.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimiento.....	v
Tabla de contenido.....	vi
Lista de figuras .....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	10
1.1.    Introducción .....	10
1.1.1.    La Leucemia Linfocítica Aguda .....	10
1.1.2.    L-Asparaginasas en el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Aguda .....	11
1.1.2.1.    Mecanismo de acción farmacológica .....	12
1.1.3.    Limitaciones en el uso de las L-Asparaginasas .....	13
1.1.3.1.    Actividad L-Glutaminasa.....	14
1.1.3.2.    Inmunogenicidad de las L-Asparaginasas.....	14
1.1.4.    Estrategias para superar las limitaciones en el uso de las L-Asparaginasas .....	16
1.2.    Justificación .....	17
1.3.    Hipótesis.....	18
1.4.    Objetivos .....	18
Capítulo 2. Metodología.....	19
2.1.    Identificación y selección <i>in silico</i> de L-Asparaginasas de <i>Streptomyces</i> .....	19
2.1.1.    L-Asparaginasas de referencia .....	19
2.1.2.    Identificación de L-Asparaginasas homólogas en <i>Streptomyces</i> .....	20
2.1.3.    Análisis funcional y clasificación.....	20
2.1.4.    Alineamiento múltiple de secuencias .....	20
2.1.5.    Análisis filogenético.....	20
2.2.    Análisis <i>in silico</i> del perfil inmunogénico de las L-Asparaginasas de <i>Streptomyces</i> .....	21
2.2.1.    Predicción de la antigenicidad .....	21
2.2.2.    Predicción de epítopos de células T, densidad de epítopos y cobertura de alelos .....	21
2.3.    Caracterización <i>in silico</i> de las L-Asparaginasas de <i>Streptomyces</i> .....	22
2.3.1.    Modelado por homología, refinamiento estructural y validación de los modelos.....	22
2.3.2.    Alineamientos estructurales .....	22

2.3.3.	Predicción del sitio activo.....	23
2.4.	Simulación de acoplamiento molecular proteína-ligando .....	24
2.4.1.	Preparación de los receptores .....	24
2.4.2.	Preparación de los ligandos .....	24
2.4.3.	Definición del espacio de búsqueda.....	25
2.4.4.	Simulación de acoplamiento molecular .....	25
2.5.	Producción de L-asparaginasas .....	25
2.6.	Ensayos de actividad enzimática .....	26
Capítulo 3.	Resultados.....	27
3.1.	Identificación de L-asparaginasas candidatas de <i>Streptomyces</i> .....	27
3.2.	Análisis funcional y clasificación.....	29
3.3.	Análisis filogenético.....	31
3.4.	Análisis <i>in silico</i> de la inmunogenicidad de las L-Asparaginasas seleccionadas.....	32
3.4.1.	Predicción de la antigenicidad .....	32
3.4.2.	Análisis de epítomos de células T, predicción de la densidad de epítomos y cobertura de alelos	33
3.5.	Ensayos de actividad enzimática.....	38
3.6.	Caracterización <i>in silico</i> de las L-Asparaginasas seleccionadas.....	40
3.5.1.	Modelado por homología, refinamiento y evaluación de la calidad del modelo .....	40
3.5.2.	Predicción del sitio activo.....	44
3.7.	Simulación de Acoplamiento Molecular .....	49
Capítulo 4.	Discusión .....	51
Capítulo 5.	Conclusiones .....	54
Perspectivas	.....	55
Literatura Citada.....		56
Anexos.....		59

## Lista de figuras

---

Figura 1. Mecanismo de desamidación de la L-asparagina por acción de la ASNasa.....	12
Figura 2. Mecanismo de acción farmacológica de las ASNasas. ....	13
Figura 3. Estructura química de la L-Asparagina y L-Glutamina.....	14
Figura 4. Distribución de especies de Streptomyces por familia. ....	27
Figura 5. Residuos conservados en las L-Asparaginasas de la familia PF00710 .....	30
Figura 6. Motivos conservados en las L-Asparaginasas de la familia PF06089. ....	30
Figura 7. Árbol filogenético de las L-Asparaginasas seleccionadas de la familia PF00710.....	31
Figura 8. Árbol filogenético de las L-Asparaginasas seleccionadas de la familia PF06089.. ..	32
Figura 9. Probabilidad de antigenicidad de las L-Asparaginasas seleccionadas.....	33
Figura 10. Densidad de epítomos y cobertura de alelos de las L-Asparaginasas evaluadas. ....	34
Figura 11. Mapeo de epítomos predichos para las L-Asparaginasas evaluadas.....	36
Figura 12. Densidad de epítomos y cobertura de alelos de L-Asparaginasas seleccionadas. ....	37
Figura 13. Resultados de la evaluación de actividad enzimática a partir de distintos medios de cultivo. ....	39
Figura 14. Estructura 3D de las L-Asparaginasas seleccionadas, modeladas por homología con I-Tasser....	41
Figura 15. Gráfico de Ramachandran para los residuos de la ASNasa WP_078979039.1.....	42
Figura 16. Gráfico de Ramachandran para los residuos de la ASNasa WP_078980718.1.....	42
Figura 17. Alineamiento múltiple de secuencias de EcAll, ErAll y SsAll-1.....	45
Figura 18. Alineamiento estructural de las L-Asparaginasas EcAll y SsAll-1.....	46
Figura 19. Sitios putativos encontrados con AutoLigand para la SsAll-2. ....	46
Figura 20. Residuos en contacto cercano con la L-asparagina, encontrados mediante acoplamiento molecular ciego. ....	47
Figura 21. Resultados de AutoLigand para EcAll.....	48
Figur9a 22. Bolsillo de unión encontrado para el dímero de EcAll. ....	48
Figura 23. Mapa de interacciones entre EcAll y la L-asparagina.....	50
Figura 24. Mapas de interacciones para los sitios A y B de la L-asparaginasa SsAll-2.....	50

## Lista de tablas

---

Tabla 1. Características farmacológicas de las tres formulaciones de ASNasa disponible actualmente. ....	12
Tabla 2. Características de las L-Asparaginasas de referencia. ....	19
Tabla 3. Medios probados para la producción de L-Asparaginasas. ....	26
Tabla 4. L-Asparaginasas homólogas a EcAII. ....	28
Tabla 5. L-Asparaginasas homólogas a ScAII. ....	29
Tabla 6. Predicción de número de epítomos de alta afinidad, CPR promedio, alelos cubiertos y densidad de epítomos para las L-Asparaginasas evaluadas. ....	35
Tabla 7. Isoenzimas de L-Asparaginasas. ....	37
Tabla 8. Resumen de la calidad de los modelos generados con I-Tasser. ....	40
Tabla 9. Residuos de los probables sitios de unión en SsAII-2. En negritas se muestran los residuos que pertenecen a algún motivo conservado en la familia PF06089. ....	45
Tabla 10. Resultados de los acoplamientos moleculares. ....	49

# Capítulo 1. Introducción

---

## 1.1. Introducción

### 1.1.1. La Leucemia Linfocítica Aguda

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es un trastorno hematológico de la médula ósea caracterizado por la proliferación descontrolada de células inmaduras de estirpe linfoide, bloqueadas en una etapa temprana de la diferenciación celular, que se acumulan y sustituyen a las células hematopoyéticas sanas en la médula ósea. El incremento de linfocitos leucémicos en la médula ósea y la consecuente sustitución de las células sanas provoca citopenias –leucopenia, trombocitopenia y neutropenia– causantes de anemia, fatiga, letargo, dolor de huesos y articulaciones, problemas respiratorios y una mayor susceptibilidad a infecciones (Pui et al., 2004; Onciu, 2009). Los linfocitos implicados en la LLA poseen rearrreglos clonales en los genes que codifican para sus receptores celulares y expresan moléculas receptoras de antígeno y otras moléculas ligadas a la diferenciación celular relacionadas con las etapas tempranas del desarrollo de los linfocitos B y T (Schwab y Harrison, 2011; Avramis, 2012). De acuerdo con el linaje de las células precursoras que se convierten en células leucémicas, la enfermedad puede ser dividida en LLA de células B (B-LLA) y LLA de células T (T-LLA) (Onciu 2009).

La leucemia linfocítica aguda ocurre predominantemente en niños en el intervalo de edad de entre 1 y 4 años, representando aproximadamente el 25% de los cánceres infantiles y cerca del 80% de las leucemias; en adultos la prevalencia de la enfermedad es de menos del 1% de los cánceres. La incidencia de la enfermedad disminuye a medida que el rango de edad aumenta y se incrementa nuevamente alrededor de los 50 años. A pesar de que la tasa de remisión completa en niños se acerca al 90%, en adultos no se ha conseguido el mismo nivel de éxito; la tasa de remisión es solo de 20 a 40%, con reincidencia en la mayoría de los casos dentro del primer año después del diagnóstico y una supervivencia media de 4 a 8 meses (Katz et al., 2015).

Aunque en la mayoría de los casos los factores de riesgo y patogenicidad asociados a la LLA no han sido claramente identificados, la etiología de la enfermedad ha sido asociada principalmente con alteraciones citogenéticas –anormalidades somáticas y germinales del cariotipo y translocaciones y deleciones cromosomales, que activan genes que controlan procesos celulares

regulatorios clave de proliferación, diferenciación y muerte celular—, la presencia de virus oncogénicos, inmunodeficiencia, la exposición a factores químicos, como pesticidas y solventes y la exposición a factores físicos como radiación ionizante (Pui et al., 2004; Bassan et al., 2016).

### 1.1.2. L-Asparaginasas en el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Aguda

El tratamiento de la LLA está dividido en 3 fases: de remisión o inducción, para reducir la carga de células leucémicas y restaurar la hematopoyesis normal; de intensificación o consolidación, para erradicar células leucémicas residuales y disminuir el riesgo de reincidencia; y, por último, terapia de continuación para eliminar cualquier rastro de la enfermedad. Durante estas fases se administran principalmente fármacos esteroides, prednisona, vincristina y la enzima L-asparaginasa (ASNasa) (Schwab y Harrison, 2008; Avramis, 2012). La ASNasa ha sido esencial en el tratamiento de la LLA desde la década de 1970, demostrando su eficacia como fármaco individual con tasas de remisión de hasta 68% (Salzer et al., 2017). La combinación de la ASNasa con otros fármacos anticáncer ha permitido alcanzar tasas de remisión de hasta 90% (Lanvers-Kaminsky, 2017).

Actualmente, existen tres formulaciones de ASNasa disponibles para el tratamiento de la LLA: dos formas nativas de la enzima, obtenidas de *Escherichia coli* (EcAll) y de *Erwinia chrysanthemi* (ErAll), y una forma químicamente modificada a partir de la ASNasa de *E. coli* (PEG-ASNasa), a la cual se han unido covalentemente moléculas de polietilenglicol. De estas, EcAll y PEG-ASNasa constituyen los tratamientos de primera línea para el tratamiento de la LLA, siendo EcAll la formulación más utilizada; ErAll se administra a los pacientes que han desarrollado hipersensibilidad a las formulaciones anteriores (Barba et al., 2017; Pieters et al., 2011).

Las tres formulaciones actualmente disponibles comparten el mismo mecanismo farmacológico. No obstante, poseen diferentes propiedades que impiden que las ASNasas sean intercambiables en la misma dosis y frecuencia de administración (Rizzari et al., 2013). En la Tabla 1 se resumen algunas de las características de EcAll, ErAll y PEG-ASNasa.

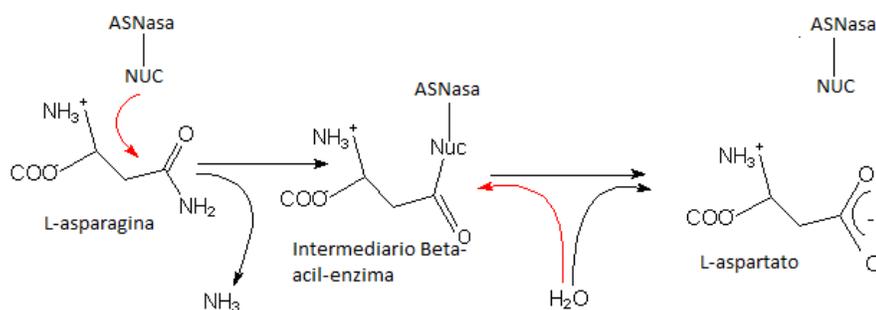
**Tabla 1.** Características farmacológicas de las tres formulaciones de ASNasa disponible actualmente.

Formulación	Actividad enzimática (IU/mg)	L-asparagina $K_m$ ( $\mu M$ )	L-glutamina $K_m$ ( $\mu M$ )	Dosis (IU/m <sup>2</sup> )	Tiempo de vida medio (días)
EcAll	280 – 400	12	3000	25000	1.28 ± 0.35
ErAll	650 – 700	12	1400	30000	0.26 ± 0.20
PEG-ASNasa	280 – 400	12	3000	500 - 8000	14.87 ± 10.12

Si bien la ASNasa ha sido utilizada principalmente como fármaco de primera línea para el tratamiento de la LLA, en los últimos años se ha acumulado evidencia de su utilidad como componente importante del tratamiento de otras neoplasias hematológicas como la leucemia mieloide aguda, mielosarcoma, linfoma, enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, reticulosarcoma y melanoma (Emadi et al., 2014; Lopes et al., 2015).

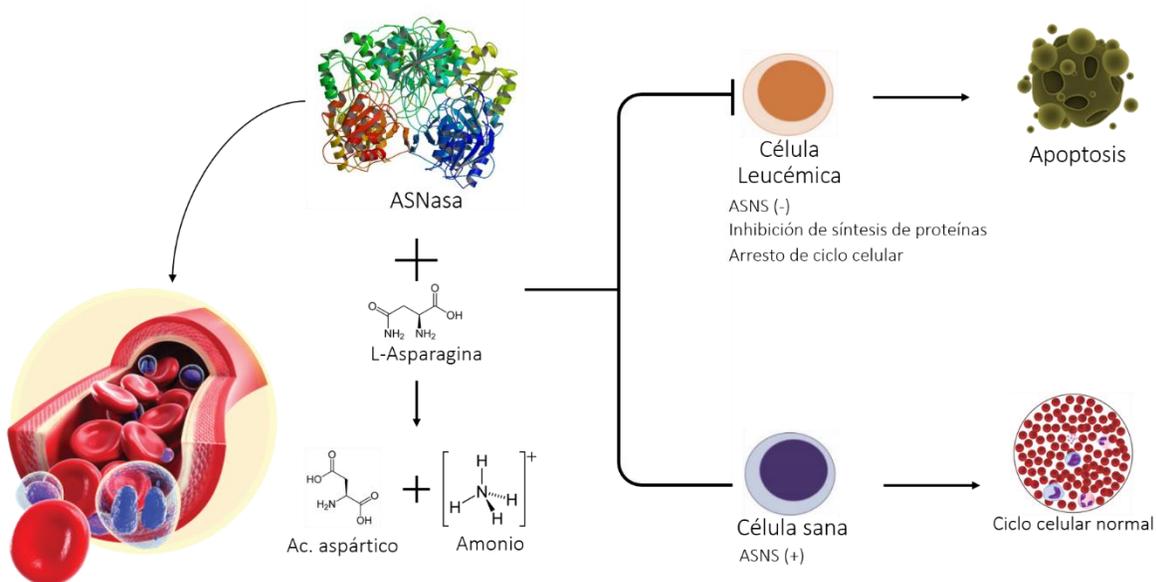
### 1.1.2.1. Mecanismo de acción farmacológica

Químicamente, la ASNasa cataliza la desamidación hidrolítica del aminoácido L-asparagina a aspartato y amonio mediante un mecanismo en el cual un grupo nucleofílico en el sitio activo de la enzima ataca el  $C_\gamma$  del sustrato, formando un intermediario acil-enzima, seguido de la eliminación de amonio, la posterior regeneración de la ASNasa y la producción de L-aspartato mediante un segundo ataque nucleofílico mediado por agua (Ali et al., 2016) (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismo de desamidación de la L-asparagina por acción de la ASNasa.

Por otra parte, la capacidad antileucémica de las ASNasas se explica a partir de las diferencias metabólicas entre células leucémicas y células sanas: debido a que los linfoblastos leucémicos tienen una alta demanda de L-asparagina, necesaria para la síntesis de proteínas, y a diferencia de las células sanas, son incapaces de sintetizar cantidades adecuadas del aminoácido, –los niveles de expresión de la enzima asparagina sintetasa son mínimos (Lanvers-Kaminsky, 2017)– por lo que la toman del suero sanguíneo. La reducción de los niveles de L-asparagina en el suero, por acción de la ASNasa, impacta negativamente la síntesis de proteínas, ADN y ARN e induce el arresto del ciclo celular en la fase G1 y posteriormente la apoptosis en las células leucémicas (Kumar et. al, 2013; Ueno et al., 1997) (Figura 2 ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).



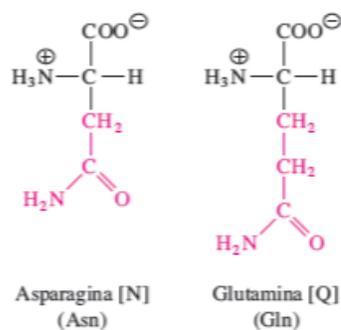
**Figura 2.** Mecanismo de acción farmacológica de las ASNasas.

### 1.1.3. Limitaciones en el uso de las L-Asparagininas

A pesar de su alto potencial antileucémico, el uso de las ASNasas en el tratamiento de la LLA se ve limitado por su toxicidad. La toxicidad puede dividirse en dos categorías principales: la respuesta inmunológica asociada con la administración intravenosa o intramuscular de la enzima y los efectos adversos relacionados con la inhibición de la síntesis de proteínas en células sanas (Lanvers-Kaminsky, 2017; Narta, Kanwar, y Azmi, 2007). Con frecuencia, la aparición de síntomas relacionados con dichos efectos adversos impide que el tratamiento pueda ser terminado, reduciendo su posibilidad de éxito (Chan et al., 2017).

### 1.1.3.1. Actividad L-Glutaminasa

Una parte de los efectos secundarios de la ASNasa ha sido relacionada con la inhibición de la síntesis de proteínas en células sanas, producto de la actividad cruzada L-Glutaminasa (GLNasa) de la enzima. La capacidad de la ASNasa para hidrolizar L-glutamina podría deberse al alto grado de semejanza que existe entre este aminoácido y la L-asparagina: la L-glutamina posee un grupo metilo adicional (Figura 3) (Ramya et. al, 2012). Entre los efectos adversos que se han reportado debido a la actividad GLNasa se encuentran la leucopenia, supresión inmune, pancreatitis aguda, hiperglucemia, anormalidades en la hemostasis, hemorragias del sistema nervioso central, anormalidades en el metabolismo de lípidos, trombosis, neurotoxicidad e insuficiencia hepática (Ali et al., 2016; Chan et al., 2017; Ramya et al., 2012).



**Figura 3.** Estructura química de la L-Asparagina y L-Glutamina.

### 1.1.3.2. Inmunogenicidad de las L-Asparaginidas

La generación de respuestas inmunológicas durante el tratamiento con ASNasa es una condición común que se ha reportado hasta en el 75% de los pacientes y que depende de la formulación utilizada, el modo de administración – intravenosa o intramuscular – y el protocolo de tratamiento (Hijiya y van der Sluis, 2015). Por ejemplo, entre 30 y 75% de los pacientes que reciben la forma nativa de la enzima de *E. coli* experimentan reacciones de hipersensibilidad y cerca del 70% desarrollan anticuerpos anti-EcAll tras la administración del fármaco (Fernández et al., 2017).

La inmunogenicidad de las ASNasas conduce a la generación de anticuerpos, que a su vez median una serie de reacciones adversas entre las que destacan la hipersensibilidad y la rápida inactivación de la enzima (Cantor et al., 2011).

Las reacciones de hipersensibilidad ocurren predominantemente durante la fase de consolidación o de mantenimiento y se clasifican en hipersensibilidad clínica y subclínica, siendo la principal causa de discontinuación de la terapia con ASNasa. Sin embargo, la hipersensibilidad subclínica, también conocida como inactivación silenciosa, puede ser potencialmente más peligrosa debido a que el paciente no presenta síntomas que alerten al médico de la resistencia al tratamiento (Barba et al., 2017; Hijiya y van der Sluis, 2015; Rizzari et al., 2013).

Las reacciones alérgicas a la ASNasa van desde urticaria leve hasta choques anafilácticos potencialmente mortales. Otros síntomas que se han reportado incluyen irritación, fiebre, vómito, edema gastrointestinal y dificultades para respirar (Lanvers-Kaminsky, 2017).

Aunque hay pocos estudios relativos al mecanismo específico que siguen las reacciones inmunológicas tras la administración de la ASNasa, Körholz et al., (1990) han señalado que, adicionalmente a la ruta clásica de activación del complemento, anticuerpos específicos del tipo IgE y la liberación de mediadores por los mastocitos podrían contribuir a los síntomas clínicos.

Con frecuencia, la principal estrategia para el manejo de la hipersensibilidad a la ASNasa consiste en el cambio de una formulación por otra. Aunque es poco probable que exista reacción cruzada al administrar ErAII después de EcAII, la ASNasa de *E. chrysanthemi* también es altamente inmunogénica y clínicamente inferior a la de *E. coli* (Cantor et al., 2011). En cuanto a la forma pegilada, un estudio recientemente publicado por MacDonald et al., (2016) mostró que a pesar de que esta formulación está diseñada para ‘enmascarar’ la inmunogenicidad de la enzima e incrementar su tiempo de vida medio en el torrente sanguíneo, también se asocia con una alta incidencia de reacciones alérgicas.

#### 1.1.4. Estrategias para superar las limitaciones en el uso de las L-Asparaginidas

Se han abordado diferentes estrategias para reducir la toxicidad de ASNasa, entre ellas las modificaciones en la estructura de la proteína –mutagénesis dirigida y modificaciones químicas– y los cambios en la formulación del fármaco son las más usuales (Ramya et al., 2012). Las modificaciones químicas más frecuentes incluyen la acilación y la conjugación covalente de la enzima con dextrán, palmitol o polietilenglicol. No obstante, en algunos casos se ha reportado el incremento de la toxicidad de ASNasa o la obtención de formas hidrofóbicas de la enzima (Ali et al., 2016). La conjugación covalente de la enzima con polietilenglicol, conocida como PEGilación, resulta en una menor incidencia de hiperglucemia, pancreatitis, ausencia de anafilaxis y mayores tiempos de vida media, que se traduce en la reducción de la frecuencia de administración del fármaco. Sin embargo, en adultos los efectos adversos pueden ser exacerbados con el uso de la forma PEGilada de la enzima debido a que toma más tiempo eliminarla de la sangre (Thomas y Le Jeune, 2016).

Por otra parte, la exploración de nuevas fuentes de ASNasas brinda la posibilidad de encontrar versiones de la enzima con diferentes características farmacológicas, potencialmente útiles para el tratamiento de la LLA y otros linfomas. Se ha observado que las ASNasas microbianas están altamente diversificadas y poseen propiedades significativamente distintas en cuanto a su estructura, afinidad por la L-asparagina y la L-glutamina, estabilidad, entre otras características; por lo que se ha propuesto que ASNasas de microorganismos diferentes a *E. coli* y *E. chrysanthemi* podrían ser más eficientes que EcAll y ErAll y tener menos efectos secundarios (Krishnapura et al., 2015). En este sentido, ASNasas atípicas, sin relación con EcAll y ErAll, como la de ASNasa tipo II de *Rhizobium etli* (Ortuño-Olea y Durán-Vargas) ha sido propuesta como una alternativa con potencial terapéutico debido a su nula actividad glutaminasa y, posiblemente, un perfil inmunogénico distinto a las opciones actuales (Moreno-Enríquez et al., 2012; Huerta-Saquero et al., 2013).

En este sentido, los microorganismos del género *Streptomyces*, actinobacterias ampliamente reconocidas como productoras de una gran variedad de metabolitos bioactivos y enzimas de interés terapéutico e industrial, han sido el grupo menos explorado para la obtención de ASNasas novedosas (Sharma et al., 2014) y representan una opción interesante ya que análisis filogenéticos han revelado que podrían constituir un grupo característico de ASNasas diferentes a las de *E. coli* y *E. chrysanthemi*, cuyas propiedades inmunológicas y enzimáticas pueden ser favorables para el tratamiento de la LLA (Moreno-Enríquez et al., 2012).

## 1.2. Justificación

A pesar del éxito obtenido tras la integración de ASNasa de *E. coli* y *E. chrysanthemi* a los regímenes terapéuticos para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda y de otros tipos de leucemias desde finales de los años 60's, el tratamiento con ASNasa continúa presentando limitaciones asociadas con la toxicidad de las enzimas. Esto hace necesaria la búsqueda de nuevas ASNasas que resulten inocuas pero efectivas como fármaco contra la LLA. La búsqueda de ASNasas en microorganismos filogenéticamente distantes y la aplicación de herramientas bioinformáticas para evaluar su toxicidad y afinidad por la L-Asparagina y L-Glutamina son enfoques viables para la obtención de nuevas ASNasas con potencial terapéutico.

### 1.3. Hipótesis

Los microorganismos del género *Streptomyces* constituyen una fuente de asparaginasas novedosas, estructuralmente distintas y con diferente perfil inmunogénico a las de *Escherichia coli* y *Erwinia chrysanthemi*, con potencial terapéutico para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda.

### 1.4. Objetivos

#### 1.4.1 General

Identificar L-asparaginasas de microorganismos del género *Streptomyces* como probables candidatas para ser usadas como fármacos para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda, utilizando un enfoque bioinformático basado en el análisis de secuencias, modelado por homología y simulaciones de acoplamiento molecular.

#### 1.4.2 Específicos

- a) Identificar y seleccionar L-asparaginasas de bacterias del género *Streptomyces* mediante el análisis bioinformático de secuencias.
- b) Analizar el perfil inmunogénico de las L-asparaginasas de *Streptomyces spp.* mediante el análisis de sus epítomos y su cobertura de alelos.
- c) Caracterizar las L-asparaginasas de *Streptomyces spp* mediante modelado por homología.
- d) Evaluar la afinidad de las L-asparaginasas de *Streptomyces spp* por la L-asparagina mediante simulaciones de acoplamiento molecular.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1. Identificación y selección *in silico* de L-Asparaginasas de *Streptomyces*

#### 2.1.1. L-Asparaginasas de referencia

Para la búsqueda de ASNasas homólogas en microorganismos del género *Streptomyces*, se definieron como referencia la ASNasa de tipo II de *Escherichia coli* (EcAII) y la ASNasa tipo II de *Streptomyces coelicolor* (ScAII). EcAII es la ASNasa más ampliamente utilizada para el tratamiento de la LLA y una de las ASNasas más ampliamente estudiadas y mejor caracterizadas; ScAII es homóloga a la ASNasa de *Rhizobium etli* y forma parte de una familia de ASNasas atípicas, con baja afinidad por la L-Glutamina (Huerta-Saquero et al., 2013; Moreno-Enríquez et al., 2012; Ortuño-Olea y Durán-Vargas, 2000). En la Tabla 2 se resumen sus principales características. Las secuencias de las ASNasas (Anexo 1) se recuperaron de la base de datos UniProtKB. Se utilizaron las secuencias completas de las ASNasas de referencia (Anexo 1), recuperadas de la base de datos UniProtKB (Chen et al., 2017).

**Tabla 2.** Características de las L-Asparaginasas de referencia.

Descripción	ASNasa tipo II, <i>Escherichia coli</i> K12, ansB	ASNasa tipo II de <i>Streptomyces coelicolor</i>
Número de acceso UniprotKB	P00805	Q9K4F5
Número de acceso PDB	3ECA	Sin estructura 3D resuelta
Familia (PFAM)	PF00710	PF06089
Familia (InterPro)	IPR004550	IPR010349
Descripción de la familia	Asparaginasa con extremo N-terminal catalítico	Asparaginasa tipo II
Tamaño (aa)	347	336
Tamaño de la ASNasa madura (aa)	326	-
Estructura global	Homotetrámero; dímero de dímeros	No caracterizada

### 2.1.2. Identificación de L-Asparaginidasas homólogas en *Streptomyces*

Se realizó una búsqueda de ASNasas homólogas en la base de datos no redundante del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), de Estados Unidos, a partir de la ASNasas de referencia, mediante la herramienta BLASTp, definiendo como blanco el taxón de los *Streptomyces* (Taxid:1883), utilizando un valor-E  $\leq 1e-06$  y excluyendo muestras ambientales y no cultivadas. Las secuencias de las ASNasas recuperadas se revisaron manualmente para excluir proteínas parciales -y de microorganismos sin especie identificada. Se utilizó además el programa CD-HIT Suite (Huang et al., 2010) para excluir redundancia y para generar conjuntos de secuencias representativas al 80, 70 y 60% de identidad.

### 2.1.3. Análisis funcional y clasificación

Las secuencias de las ASNasas candidatas se analizaron mediante la herramienta HMMER en el servidor PFAM (Finn et. al., 2011; Finn et. al., 2016). PFAM provee herramientas para la clasificación de proteínas, predicción de dominios, análisis y anotación funcional de secuencias.

### 2.1.4. Alineamiento múltiple de secuencias

Las secuencias completas de las ASNasas candidatas se alinearon utilizando el programa Clustal Omega (Sievers et. al., 2011). Se utilizaron los perfiles de las ASNasas (familia PF00710 y PF06089), obtenidos de PFAM en formato '.hmm' y se realizaron 1000 iteraciones para construir los alineamientos múltiples de secuencias. El resto de los parámetros se mantuvieron por omisión en sus valores.

### 2.1.5. Análisis filogenético

Para el análisis de la filogenia de las ASNasas candidatas se eliminaron las regiones más divergentes y pobremente alineadas de los alineamientos múltiples de secuencias mediante el programa GBLOCKS (Talavera y Castresana, 2007). Los alineamientos resultantes se utilizaron para construir árboles filogenéticos mediante el método de máxima verosimilitud, utilizando el modelo de sustitución de Jones-Taylor-Thornton (Jones et al., 1992), con el programa MEGA (Kumar, et al., 2015). Se realizaron 1000 réplicas y el árbol se construyó mediante la regla de mayoría, incluyendo todos los grupos presentes más del 50% del tiempo en los árboles evaluados.

## 2.2. Análisis *in silico* del perfil inmunogénico de las L-Asparaginasas de *Streptomyces*

### 2.2.1. Predicción de la antigenicidad

Para predecir la probabilidad de antigenicidad de las ASNasas candidatas se utilizó el servidor ANTIGENpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>). ANTIGENpro utiliza algoritmos entrenados a partir de datos de microarreglos de proteínas de diferentes patógenos para predecir la probabilidad de antigenicidad de las proteínas, sin necesidad de realizar alineamientos con antígenos conocidos, con hasta un 82% de exactitud (Magnan et al., 2010).

### 2.2.2. Predicción de epítomos de células T, densidad de epítomos y cobertura de alelos

La secuencia aminoacídica de cada ASNasa candidata se analizó, en busca de probables epítomos de células T, utilizando el servidor IEDB MHC II (<http://tools.iedb.org/mhcii/>). Se predijeron los epítomos de células T para los alelos HLA-DRB1\*0101, HLA-DRB1\*0301, HLA-DRB1\*0401, HLA-DRB1\*0701, HLA-DRB1\*0801, HLA-DRB1\*1101, HLA-DRB1\*1301 y HLA-DRB1\*1501, que en conjunto representan a más del 95% de la población (Paul et al., 2015), mediante el método de consenso (Wang et al., 2010). Brevemente, la secuencia de cada proteína se divide en péptidos con una longitud de 15 aminoácidos, traslapados por un residuo. Posteriormente, se predice la afinidad de unión de cada péptido a las moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA) producidas por cada alelo, mediante tres métodos diferentes (SMN, NN-Align, Comb-Lib o Sturniolo, según se encuentren disponibles para el alelo evaluado). Para cada péptido, se genera un rango percentil al compararlo con la afinidad de unión de 5 millones de secuencias aleatorias de péptidos de 15 aminoácidos y se calcula el rango percentil consenso (CPR) como el promedio de la afinidad predicha por los tres métodos usados. Adicionalmente, el programa identifica diferentes núcleos de 9 aminoácidos (epítomos consenso) en los 15-meros predichos.

Para el análisis de la contribución de los epítomos de células T a la inmunogenicidad, los epítomos predichos se dividieron en dos categorías: de alta afinidad, con un CPR menor que dos y de baja afinidad, péptidos con un CPR mayor que dos; sólo los epítomos consenso, identificados con el método de Sturniolo (Sturniolo et al., 1999), y con un CPR < 1, fueron tomados en cuenta para el análisis. La densidad de epítomos (ED) se calculó de acuerdo con la fórmula reportada (ecuación 1) por Santos et al (2013) y la cobertura de alelos se calculó como el número de alelos cubiertos por los epítomos consenso; a menor número de alelos cubiertos, un menor porcentaje de la población será propensa a desarrollar hiper sensibilidad a la ASNasa.

$$ED = \frac{\text{Epítomos predichos} * (2 - \text{Promedio de la afinidad}(cpr))}{\text{Tamaño de la proteína} - \text{Tamaño del epítopo} + 1}$$

Ecuación (1)

## 2.3. Caracterización *in silico* de las L-Asparaginasas de *Streptomyces*

### 2.3.1. Modelado por homología, refinamiento estructural y validación de los modelos

La estructura tridimensional de las ASNasas seleccionadas se modeló por homología, a partir de su secuencia primaria, utilizando el servidor I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). El proceso de modelado por homología consiste en 4 pasos generales: identificación de los modelos estructurales, ensamble iterativo de las nuevas estructuras, selección de las estructuras con mejor energía y refinamiento y anotación funcional con base en la estructura predicha (Zhang, 2008).

Para mejorar la calidad los modelos, se sometieron a un refinamiento estructural con ModRefiner (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>). ModRefiner es un algoritmo para el refinamiento estructural de proteínas, a nivel atómico y de alta resolución (Xu y Zhang, 2011).

La calidad de los modelos tridimensionales generados con I-Tasser se evaluó utilizando los programas RAMPAGE (Lovell et al., 2003; <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) y Verify3D (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/>). En el gráfico de Ramachandran se representan las relaciones entre los ángulos de rotación Phi (entre el N y el C alfa) y Psi (entre el C alfa y el C del esqueleto) del esqueleto polipeptídico. Es útil para evaluar qué residuos se encuentran en regiones permitidas y en regiones no permitidas -por impedimentos estéricos- y ,consecuentemente, evaluar la calidad del modelo estructural (Lovell et al., 2003). Por otro lado, Verify3D mide la compatibilidad de la estructura 3D con su secuencia de aminoácidos, descrita por tres parámetros del ambiente en el que se encuentran los residuos: área de residuos enterrados, fracción de la cadena lateral cubierta por átomos polares (oxígeno y nitrógeno) y la estructura secundaria local (Eisenberg, Luthy, y U. Bowie, 1997).

### 2.3.2. Alineamientos estructurales

Los alineamientos estructurales de los modelos tridimensionales se realizaron utilizando las herramientas 'Match' (para superposición de las estructuras) y 'MatchMaker' (para realizar alineamientos a partir de la superposición) del software UCSF Chimera (Pettersen et. al., 2004). Match y Matchmaker identifican cuáles residuos deben superponerse, utilizando información de la secuencia y la estructura secundaria, permitiendo la superposición de estructuras similares, incluso si la identidad entre las secuencias es baja (< 25%).

### 2.3.3. Predicción del sitio activo

Para predecir el sitio activo de las ASNasas seleccionadas se utilizaron tres diferentes enfoques: comparación de las secuencias y estructuras con ASNasas que hayan sido caracterizadas; un segundo enfoque basado en acoplamiento moleculares ciegos para encontrar ‘hot-spots’ de residuos que unen ligandos; y, por último, la búsqueda de regiones con alta afinidad, sin usar ligandos, basada en la evaluación de mapas de afinidad de los átomos que componen la superficie y cavidades en las ASNasas.

Para las ASNasas de la familia PF00710, los aminoácidos del sitio activo se eligieron a partir del alineamiento múltiple de secuencias y el alineamiento estructural con EcAll; diversos estudios han mostrado que los residuos catalíticos más importantes son las treoninas 12 y 89 (en la EcAll) y que estas se encuentran altamente conservadas en las ASNasas de la familia PF00710. Otros residuos importantes, que ayudan a estabilizar la unión del ligando y a completar las dos triadas catalíticas necesarias para llevar a cabo la hidrólisis de la L-asparagina son: Ser 58, Gln 59, Asp 90, Lys 162, Asn 248 y Clu 283 (Sanches et al, 2016).

En cuanto a las ASNasas de la familia PF06089, hasta ahora no existe información referente a los aminoácidos que componen el sitio activo en ASNasas de la familia PF06089; no obstante, se ha propuesto que algunos de los residuos que componen un motivo altamente conservado podrían tener algún papel en la unión de la L-asparagina (Borek y Jaskólski, 2001). La búsqueda de los sitios putativos para las ASNasas de esta familia se llevó a cabo mediante dos enfoques diferentes: acoplamiento molecular ciego y análisis basado en energía y volumen de la superficie y cavidades.

Para el primer caso, el acoplamiento molecular ciego se realizó con AutoDock sobre toda la proteína, usando una rejilla de 60 x 60 x 60 Å, con puntos separados por 1 Å. Se utilizó el algoritmo genético Lamarckiano, con 1000 corridas, una población igual a 250,  $2.5 \times 10^6$  evaluaciones, una tasa de mutación igual a 0.02 y 27000 generaciones. En el caso del segundo enfoque, se utilizó AutoLigand para predecir la localización del sitio activo. AutoLigand es una herramienta, parte del paquete Autodock, desarrollada para identificar probables sitios de unión sobre o dentro de proteínas, así como el volumen óptimo, la forma y los mejores tipos de átomos en los sitios identificados (Harris et. al., 2008). Brevemente, AutoLigand identifica sitios de máxima afinidad –a partir de los mapas de afinidad generados por AutoGrid– inundando la estructura de la proteína con una serie de volúmenes contiguos (un conjunto de puntos que representan potenciales centros atómicos para los átomos de un ligando) que migran, cambian de forma y de tamaño para encontrar las regiones con mejor energía y menor volumen (Harris et al., 2007).

## 2.4. Simulación de acoplamiento molecular proteína-ligando

### 2.4.1. Preparación de los receptores

La preparación de las estructuras para el acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando el software Autodock Tools (Sanner, 1999; Morris et. al., 2009).

La estructura cristalográfica de la ASNasa tipo II de *E. coli* se recuperó del banco de datos de proteínas RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>; Berman et. al., 2000), con el número de acceso 3ECA (Swain et. al., 1993). El procesamiento de la estructura consistió en la remoción de moléculas de agua y del ligando con el que fue cristalizada la proteína. Posteriormente, se asignaron los tipos de átomos, se eliminaron hidrógenos no polares y se añadieron hidrógenos polares. Por último, se asignaron cargas parciales mediante el método de Gasteiger (Gasteiger y Marsili, 1978).

Las estructuras de las ASNasas candidatas, una vez refinadas, se prepararon utilizando 'Dock prep' en UCSF Chimera; la preparación de las estructuras incluye la eliminación de moléculas de agua, reparación de cadenas laterales faltantes, adición de hidrógenos y la asignación de cargas parciales. Adicionalmente, se fusionaron hidrógenos no polares y se reasignaron cargas parciales, mediante el método de Gasteiger, utilizando AutoDock Tools.

### 2.4.2. Preparación de los ligandos

La estructura tridimensional de los ligandos ASN y GLN, en formato PDB, se obtuvo del repositorio DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>; Wishart et. al., 2017), con los números de acceso DB00174 y DB00130, respectivamente.

La preparación de los ligandos se llevó a cabo utilizando Autodock Tools y consistió en la adición de hidrógenos polares, la eliminación de los hidrógenos no polares, la asignación de tipos de átomos, el cálculo de cargas parciales mediante el método de Gasteiger y finalmente, la asignación de los centros de rotación.

### 2.4.3. Definición del espacio de búsqueda

Para cada ASNasa, la caja de búsqueda –el sitio en el que se llevó a cabo la simulación de acoplamiento molecular– se centró en los sitios activos propuestos previamente. El tamaño de la caja se definió de manera que cubriera todos los residuos del sitio de unión de ligando y el tamaño de rejilla usado fue de 0.375 Angstroms.

### 2.4.4. Simulación de acoplamiento molecular

Los acoplamientos moleculares se realizaron con el software Autodock 4.2, empleando el algoritmo genético Lamarckiano, con 100 corridas, para un tamaño de población igual a 150, con  $2.5 \times 10^6$  evaluaciones, una tasa de mutación igual a 0.02 y 27000 generaciones.

## 2.5. Producción de L-asparaginasas

De los análisis previos, se seleccionaron las L-asparaginasas de las cepas de *S. coelicolor*, *S. varsoviensis*, *S. scabrisporus* y *S. albireticuli*, las cuales fueron obtenidas del Agricultural Research Service Culture Collection (ARS Culture Collection NRRL, Peoria Illinois, EUA).

Para probar las ASNasas seleccionadas, se cultivaron las cepas de los microorganismos que las producen a 28° C, durante 72 – 120 h, en diferentes medios de cultivo (Tabla 3). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se recuperaron mediante centrifugación (5000 rpm, durante 25 minutos). Se conservó una muestra de sobrenadante para análisis posteriores y la pastilla celular se resuspendió en buffer de lisis ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 292 mM, pH 7.4 o Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, 0.25 mg/mL de lisozima). La pastilla celular, resuspendida en buffer de lisis, se incubó durante 30 minutos, a 37°C para facilitar la acción de la lisozima sobre la pared celular. Posteriormente, las células se lisaron, mediante ultrasonido, en ciclos de 9.9 s, por 15 minutos (Ultrasonic Cell Crusher YM-1000Y), para obtener extractos enzimáticos (sobrenadante de la lisis). Adicionalmente, los sobrenadantes y extractos enzimáticos se dializaron en buffer de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [],  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  [], pH 7.4) utilizando membranas de 14 KDa, para eliminar rastros de amonio que pudiesen interferir con las mediciones de actividad enzimática.

**Tabla 3.** Medios probados para la producción de L-Asparaginasas.

<b>Componente</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>
Dextrosa	-	0.5%	-	-	-
Almidón Soluble	-	-	0.5%	0.5%	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 mM	-	-	-	-
Extracto de malta				-	0.5%
Extracto de levadura	-	-	-	0.5%	0.5%
L-Asparagina			0.5%		
Medio mineral base			100 mL		

## 2.6. Ensayos de actividad enzimática

Los ensayos actividad enzimática ASNasa de los extractos y los sobrenadantes se llevaron a cabo mediante condiciones previamente establecidas en el laboratorio: una mezcla de reacción de 125  $\mu$ L (25  $\mu$ L de extracto enzimático, más 100  $\mu$ L de L-asn 12.5 mM) se incubó, a 37°C, durante 1 hora. La reacción se detuvo agregando 125  $\mu$ L de ácido tricloroacético al 8%. Posteriormente, a 20  $\mu$ L de la mezcla de reacción se agregaron 180  $\mu$ L de agua, 1 mL de solución 1 (Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO] [0.05 g/L] , C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O [10 g/L]) y 1 mL de solución 2 (NaOH [5 g/L], NaClO [2.38 mL/L]). La cantidad de amonio liberado se midió a 625 nm mediante espectrofotometría UV-Vis (ESPECTRO). Los ensayos de actividad enzimática se realizaron a los 0, 7.5, 15, 30 y 60 minutos de reacción

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1. Identificación de L-asparaginasas candidatas de *Streptomyces*

La búsqueda BLASTp, a partir de la secuencia de la ASNasa tipo II de *E. coli*, permitió identificar 296 secuencias de probables ASNasas, pertenecientes a microorganismos del género *Streptomyces*. Después de la exclusión de proteínas parciales y secuencias provenientes de microorganismos sin especie identificada, se obtuvieron 136 secuencias de ASNasas, las cuales se analizaron mediante el programa CD-HIT Suite para excluir redundancia al 100%, dando como resultado 135 secuencias distintas de ASNasas. Por último, el clúster de secuencias representativas, construido con el programa CD-Hit Suite, con un valor de corte igual al 60% de identidad, agrupó 19 secuencias de probables ASNasas (Tabla 4).

Por otro lado, se identificaron 703 secuencias de probables ASNasas al utilizar como referencia la ASNasa tipo II de *S. coelicolor*. La exclusión de proteínas parciales, secuencias de ASNasas de microorganismos sin especie identificada y redundancia al 100% dio como resultado un grupo de 311 probables ASNasas. Por último, en el clúster de secuencias representativas, al 60% de identidad, se agruparon 7 secuencias de probables ASNasas (Tabla 5).

la comparación de los resultados del BLASTp mostró que hay una mayor abundancia de secuencias de la familia PF06089 que PF00710 en los *Streptomyces*. Además, se encontró que, de las especies de *Streptomyces* identificados en el BLAST, cerca del 20% tiene una isoenzima de cada familia (Figura 4). En comparación, se ha señalado que muchos microorganismos Gram-negativos tienen al menos dos isoenzimas de la familia PF00710 (Fernández y Zúñiga, 2006) y en *E. coli*, se ha reportado la existencia de una tercera isoenzima, más cercana a las ASNasas de plantas que a las del tipo bacteriano o rizobiales (Correia da Silva et al., 2018).

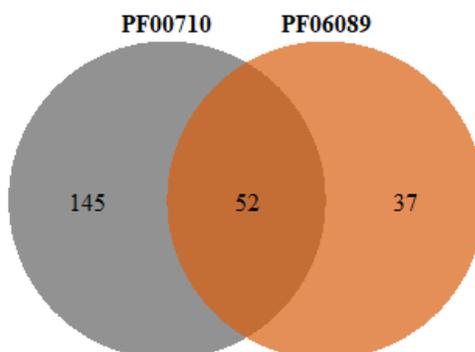


Figura 4. Distribución de especies de *Streptomyces* por familia, de acuerdo con los resultados de la búsqueda BLAST.

**Tabla 4.** L-Asparaginasas homólogas a EcAll.

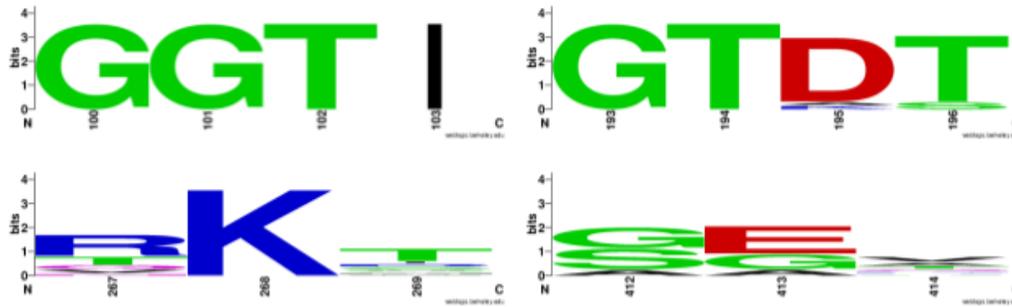
<b>Número de Acceso</b>	<b>Organismo</b>	<b>Longitud (a.a.)</b>
WP_053609500.1	<i>Streptomyces purpurogeneiscleroticus</i>	373
WP_053610569.1	<i>Streptomyces purpurogeneiscleroticus</i>	338
WP_055617501.1	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	380
WP_051815467.1	<i>Streptomyces lavenduligriseus</i>	363
WP_078649241.1	<i>Streptomyces fradiae</i>	350
EFL23513.1	<i>Streptomyces himastatinicus</i> ATCC 53653	351
WP_014151616.1	<i>Streptomyces cattleya</i>	331
WP_095730579.1	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	333
WP_078965752.1	<i>Streptomyces aureocirculatus</i>	343
WP_078513220.1	<i>Streptomyces purpureus</i>	421
WP_009718687.1	<i>Streptomyces himastatinicus</i>	347
WP_079189481.1	<i>Streptomyces paucisporeus</i>	384
WP_052425051.1	<i>Streptomyces fulvoviolaceus</i>	340
ELP65653.1	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	358
WP_070201703.1	<i>Streptomyces nanshensis</i>	347
KWW98572.1	<i>Streptomyces thermoautotrophicus</i>	333
WP_073950513.1	<i>Streptomyces kebangsaanensis</i>	333
WP_030748190.1	<i>Streptomyces griseus</i>	329
WP_059134811.1	<i>Streptomyces alboniger</i>	332

**Tabla 5.** L-Asparaginasas homólogas a ScAll

No de Acceso	Organismo	Tamaño (a.a.)
ARZ68596.1	<i>Streptomyces albireticuli</i>	428
CDR15801.1	<i>Streptomyces iranensis</i>	387
SOD64826.1	<i>Streptomyces zhaozhouensis</i>	316
WP_020554088	<i>Streptomyces scabrisporus</i>	332
WP_044373749	<i>Streptomyces ahygroscopicus</i>	330
WP_078645645	<i>Streptomyces varsoviensis</i>	348
WP_078980718.1	<i>Streptomyces scabrisporus</i>	327

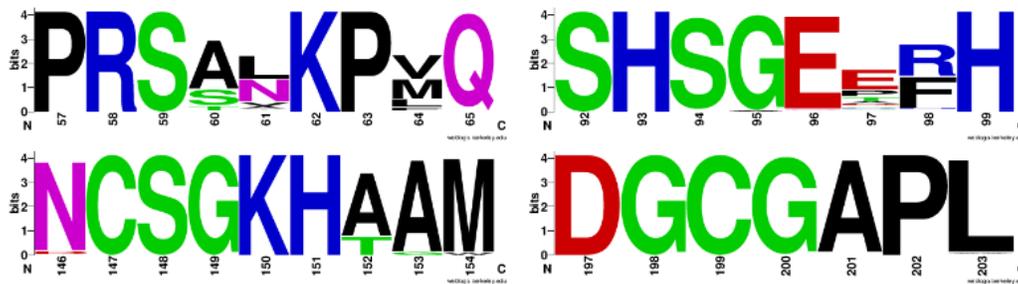
### 3.2. Análisis funcional y clasificación

El análisis de las secuencias del clúster al 60% de identidad de ASNasas homólogas a EcAll, utilizando el servidor HMMR (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) y las bases de datos PFAM e InterPro, mostró que estas pertenecen a la familia y súper familia de las Asparaginasas/Glutaminasas, con dominio ASNasa en el extremo N-terminal de la proteína (PFAM: PF00710, InterPro: IPR004550). De la familia PF00710, la enzima mejor estudiada es la ASNasa tipo II de *E. coli* (EcAll). Diversos análisis de la estructura cristalográfica de la ASNasa tipo II de *E. coli* han permitido identificar los residuos presentes en el sitio de unión del sustrato L-Asparagina: Thr 12, Tyr 25, Ser 58, Gln 59, Thr 89, Asp 90, Lys 162 de la subunidad A y Asn 248 y Glu 283 de la subunidad C. Se ha propuesto que Thr 12 - Lys 162- Asp 90 y Thr12- Tyr 25 – Glu 283 son las triadas catalíticas que llevan a cabo la hidrólisis de la L-Asparagina; siendo Thr 12 y Thr 89 los residuos involucrados en los ataques nucleofílicos sobre el sustrato (Sanches et. al., 2007; Gesto et. al., 2013). Los residuos Treonina 12, Treonina 89 y Lisina 162 (posiciones de acuerdo a la numeración en la ASNasa madura de *E. coli*) se encuentran altamente conservados en las ASNasas de la familia PF00710, mientras que otros residuos implicados en la catálisis presentan sustituciones por aminoácidos de diferentes naturalezas: por ejemplo, tirosina 25 (aminoácido con cadena lateral hidrofóbica) y ácido aspártico 90 (cadena lateral cargada negativamente) se encuentran sustituidos en las ASNasa candidatas por ácido glutámico (cadena lateral negativa), arginina (cadena lateral positiva), glutamina (cadena lateral sin carga) o fenilalanina y leucina (cadenas laterales hidrofóbicas al igual que la tirosina) (Figura 5).



**Figura 5.** Residuos conservados en las L-Asparaginases de la familia PF00710. El logo de las secuencias fue generado con el servidor WebLogo (Crooks et al., 2004), disponible en <https://weblogo.berkeley.edu/>.

Por otra parte, el análisis de las secuencias homólogas a ScAll mostró que estas pertenecen a una familia poco estudiada de ASNasas -con número de acceso PF06089 en PFAM-, termolábiles, reprimidas por la fuente de carbono e inducibles por L-asparagina. De esta familia, la ASNasa tipo II de *R. etli* ha sido la más estudiada y representa una opción interesante para el tratamiento de la LLA debido a su nula actividad GLNasa (Huerta-Saquero et al., 2013; Moreno-Enríquez et al., 2012). El análisis de las secuencias recuperadas a partir de la búsqueda BLASTp permitió identificar los motivos NCSGKHxAM, DGCGAPL, SHSGEx(2)H y PRSx(2)KPxQ (Figura 6). Estos motivos muestran diferencias notables con las regiones conservadas en las ASNasas de la familia PF00710.

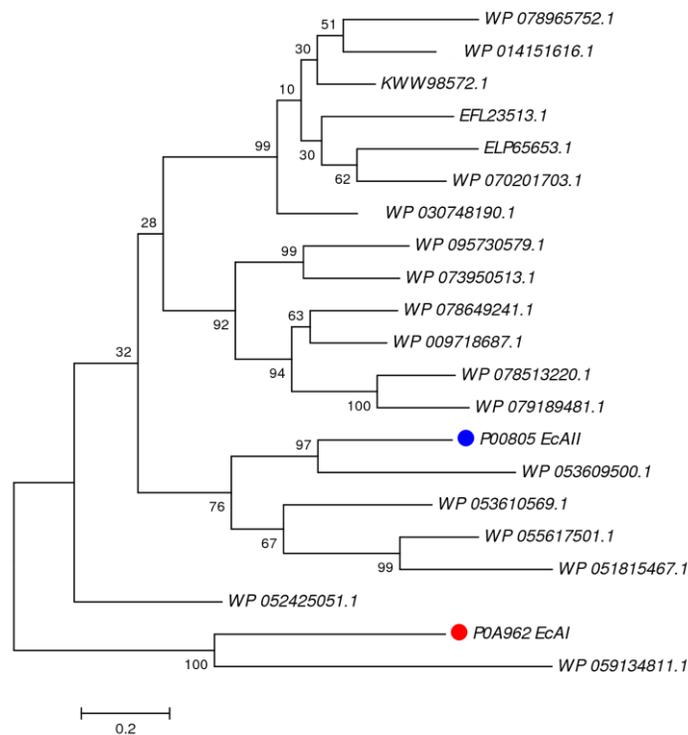


**Figura 6.** Motivos conservados en las L-Asparaginases de la familia PF06089. El logo de las secuencias fue generado con el servidor WebLogo (Crooks et al., 2004), disponible en <https://weblogo.berkeley.edu/>.

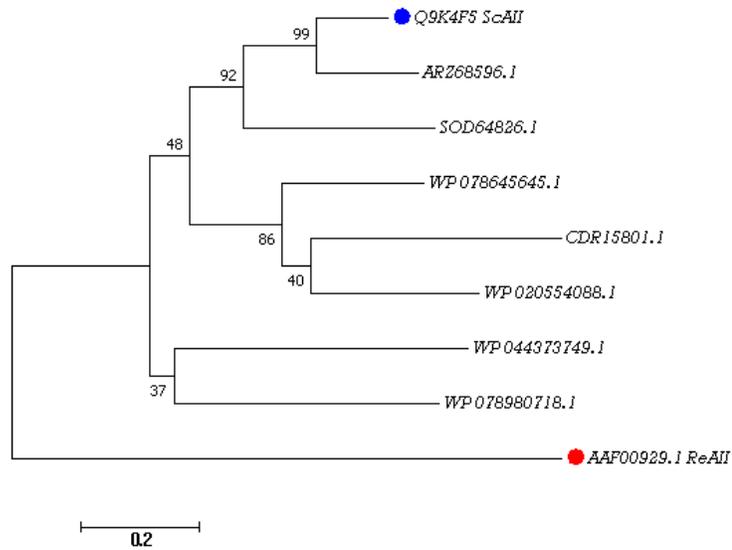
### 3.3. Análisis filogenético

Para la construcción del árbol filogenético de las ASNasas de la familia PF00710, se añadió al alineamiento la secuencia de la ASNasa tipo I de *E. coli* (EcAI), con el fin de conocer la relación entre esta y las ASNasas candidatas. EcAI pertenece a la misma familia de proteínas que EcAII, sin embargo, debido que posee una menor afinidad por la L-asparagina, no representa una opción terapéutica para el tratamiento de la LLA. De acuerdo con los resultados, la ASNasa con número de acceso WP\_059134811.1 se agrupa en el mismo clado que EcAI, por lo que fue excluida de análisis posteriores. Por otro lado, la secuencia filogenéticamente más cercana a EcAII corresponde a WP\_053609500.1; la más lejana a WP\_052425051.1 (Figura 7).

En cuanto a las ASNasas homólogas a ScAII, las secuencias de aminoácidos se alinearon con respecto al perfil de la familia PF06089, obtenido de PFAM, y se añadió la secuencia de la ASNasa de *R. etli*.



**Figura 7.** Árbol filogenético de las L-Asparagininas seleccionadas de la familia PF00710. El círculo azul indica la posición de la ASNasa tipo II de *E. coli* en el árbol; el círculo rojo, la posición de la ASNasa tipo I.

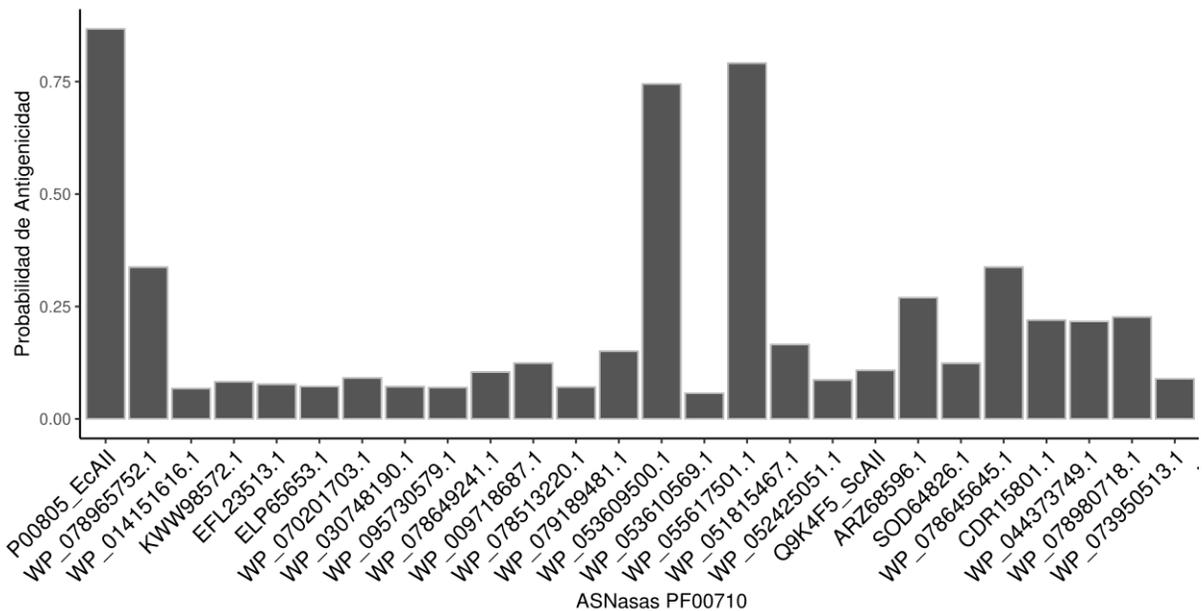


**Figura 8.** Árbol filogenético de las L-Asparagininas seleccionadas de la familia PF06089. El círculo azul indica la ASNasa de *S. coelicolor*; el círculo rojo la ASNasa de *R. etli*.

### 3.4. Análisis *in silico* de la inmunogenicidad de las L-Asparagininas seleccionadas

#### 3.4.1. Predicción de la antigenicidad

De acuerdo con los resultados de ANTIGENpro, las ASNasas candidatas, de ambas familias, tienen una menor probabilidad de ser antigénicas que la ASNasa de referencia EcAII (Figura 9). Sin embargo, las ASNasas WP\_053609500.1 y WP\_055617501.1 tendrían, de acuerdo con las predicciones, una probabilidad de antigenicidad similar a EcAII y WP\_053610569.1 sería la ASNasa con menor probabilidad de antigenicidad.



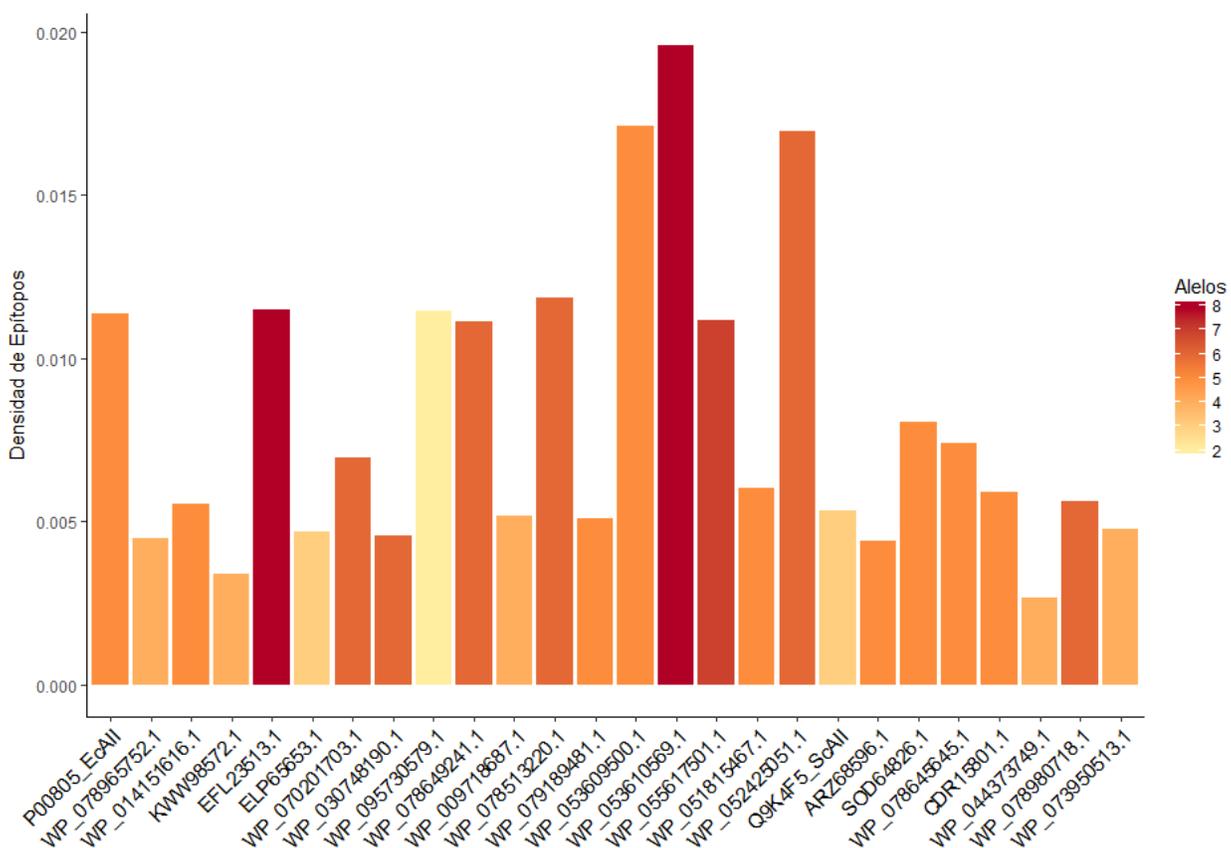
**Figura 9.** Probabilidad de antigenicidad de las L-Asparaginases seleccionadas.

### 3.4.2. Análisis de epítomos de células T, predicción de la densidad de epítomos y cobertura de alelos

La predicción de probables epítomos de células T mediante el método de consenso permitió identificar cerca de 70,000 péptidos para el conjunto de ASNasas evaluadas (familias PF00710 y PF06089). Sin embargo, es poco probable que todos los péptidos predichos sean epítomos reales. Para reducir la sobreestimación y redundancia se tomaron como base los siguientes criterios: se seleccionaron los núcleos de los epítomos predichos, calculado con el método de Sturniolo (Sturniolo et. al., 1999) y se consideraron los núcleos de alta afinidad de unión por moléculas del MHC clase II. El método de Sturniolo es considerado el algoritmo más preciso para la clasificación de núcleos de epítomos por los desarrolladores del método de consenso del IEDB (Cantor et. al., 2011). La identificación de la región central mínima, o núcleo del epítomo, en contacto con el bolsillo de unión del MHC clase II resulta crucial para la correcta clasificación del péptido como epítomo.

A partir de los epítomos predichos, se calculó la densidad de epítomos (ED), el número total de epítomos de alta afinidad, el CPR total de los epítomos de alta afinidad y el número de alelos HLA cubiertos por cada ASNasa. Los resultados muestran que a las ASNasas con número de acceso WP\_053609500.1, WP\_053610569.1, EFL23513.1, WP\_095730579.1, WP\_078513220.1 y WP\_052425051.1 tienen una mayor densidad de epítomos que la referencia (P00805\_EcAII; ED = 0.0114, 5 alelos cubiertos).

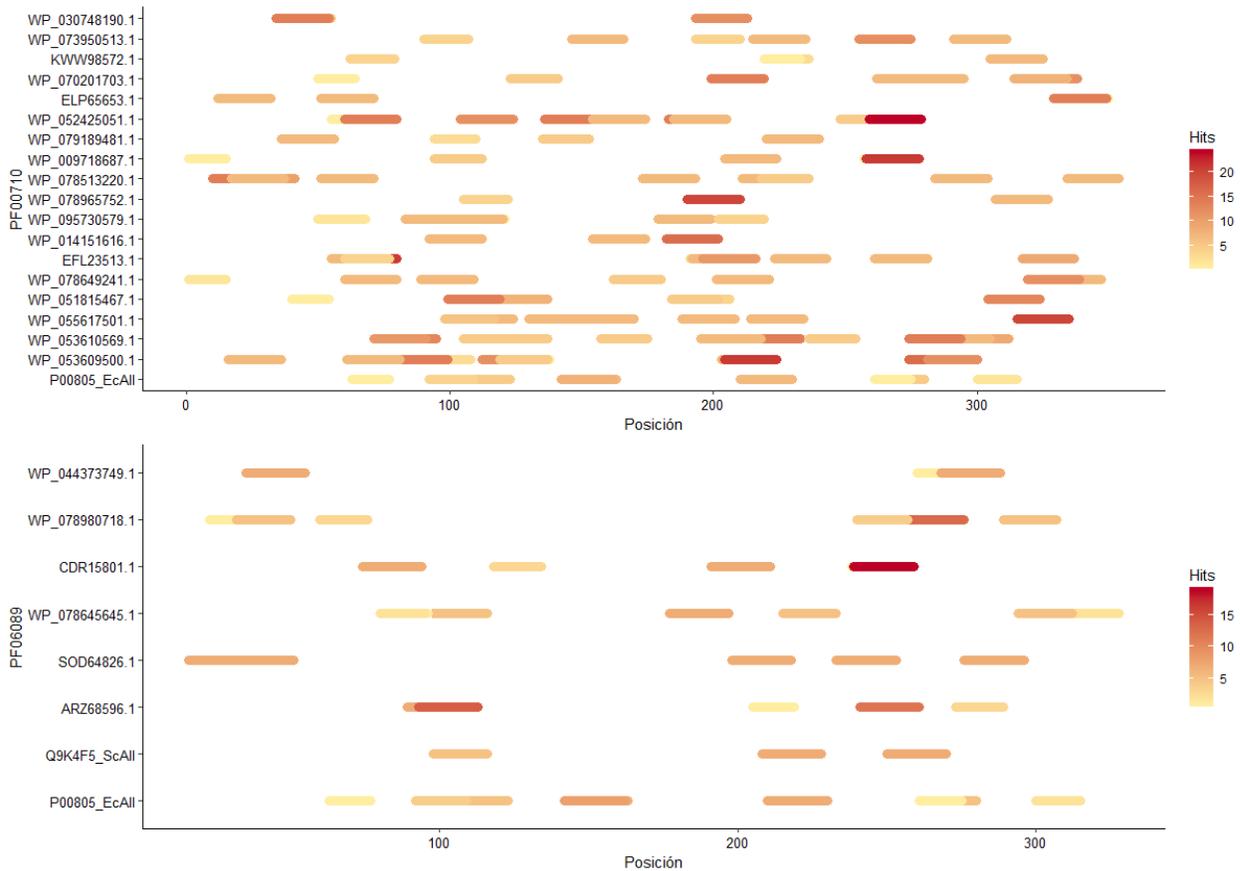
Por otra parte, la ASNasa con menor densidad de epítomos predicha es WP\_044373749.1, con un valor de 0.0027 y una cobertura de 4 alelos. Las ASNasas con menor cobertura de alelos serían WP\_095730579.1, con 2 alelos, ELP65653.1 (3 alelos) y Q9K4F5 con 3 alelos. Sin embargo, de estas últimas WP\_095730579.1 tiene una densidad de epítomos similar a la de EcAII (Tabla 6; Figura 10). Adicionalmente, la distribución de los epítomos fue mapeada en la secuencia de las ASNasas evaluadas (Figura 11). De la Figura 10 se observa que las ASNasas de la familia PF06089 tienden a tener una menor densidad de epítomos, así como menor cobertura de alelos que las de la familia PF00710. La ASNasa WP\_020554088.1 no fue considerada en el análisis debido a que su secuencia fue dada de baja de la base de datos del NCBI



**Figura 10.** Densidad de epítomos y cobertura de alelos de las L-Asparaginases evaluadas.

**Tabla 6.** Predicción de número de epítomos de alta afinidad, CPR promedio, alelos cubiertos y densidad de epítomos para las L-Asparagininas evaluadas.

ASNasa	Epítomos	CPR promedio	Alelos	Densidad de epítomos
P00805_EcAll	10	0.6383	5	0.0114
WP_053609500.1	12	0.5174	5	0.0171
WP_053610569.1	14	0.5381	8	0.0196
WP_055617501.1	7	0.4532	7	0.0112
WP_051815467.1	6	0.6673	5	0.0060
WP_078649241.1	7	0.4554	6	0.0111
EFL23513.1	10	0.6054	8	0.0115
WP_014151616.1	3	0.4024	5	0.0056
WP_095730579.1	8	0.5346	2	0.0115
WP_078965752.1	3	0.4987	4	0.0045
WP_078513220.1	9	0.4551	6	0.0119
WP_009718687.1	5	0.6480	4	0.0052
WP_079189481.1	4	0.5217	5	0.0051
WP_052425051.1	10	0.4369	6	0.0170
ELP65653.1	5	0.6717	3	0.0047
WP_070201703.1	7	0.6637	6	0.0069
KWW98572.1	4	0.7254	4	0.0034
WP_073950513.1	6	0.7424	4	0.0048
WP_030748190.1	3	0.5125	6	0.0046
Q9K4F5_ScAll	3	0.4167	3	0.0053
ARZ68596.1	5	0.6283	5	0.0044
SOD64826.1	5	0.5046	5	0.0080
WP_078645645.1	7	0.6404	5	0.0074
CDR15801.1	5	0.5510	5	0.0059
WP_078980718.1	6	0.7003	6	0.0056
WP_044373749.1	3	0.7114	4	0.0027



**Figura 11.** Mapeo de epítomos predichos para las L-Asparagininasas evaluadas.

A partir de los resultados anteriores se seleccionaron las ASNasas con menor cobertura de alelos, menor densidad de epítomos y menor probabilidad de antigenicidad para llevar a cabo análisis posteriores. En este sentido, se seleccionó Q9K4F5 (*S. coelicolor*) como la mejor opción y se adquirió de la colección de cultivos del servicio de investigación en agricultura (ARS, por sus siglas en inglés; <https://nrrl.ncaur.usda.gov/>). Se adquirieron también los microorganismos *S. scabrisporus* (ASNasa WP\_078980718.1, ED = 0.0056, 6 alelos cubiertos), *S. albireticuli* (ASNasa ARZ68596.1, ED = 0.0044, 5 alelos cubiertos) y *S. varsoviensis* (ASNasa WP\_078645645.1, ED = 0.0074, 5 alelos cubiertos) por ser los microorganismos disponibles al momento de adquisición.

Por otra parte, tomando como referencia las cepas seleccionadas, se realizó una revisión detallada de los resultados de la búsqueda BLASTp y una comparación con UniProtKB -una base de datos curada, consistente y de alta exactitud- que reveló que tanto *S. scabrisporus* como *S. albireticuli* podrían tener isoenzimas de diferentes familias (Tabla 7). En el caso de *S. scabrisporus*, hipotéticamente poseería dos ASNasas: WP\_078980718.1 (de la familia PF06089) y WP\_078979039.1 (de la familia PF00710). En tanto

que *S. albireticuli* poseería, hipotéticamente, una ASNasa de la familia PF00710: WP\_095584437.1 y una ASNasa de la familia PF06089.11, con número de acceso ARZ68596.1. Mientras que para *S. varsoviensis* y *S. coelicolor* no se encontraron isoenzimas de otras familias.

Tabla 7. Isoenzimas de L-Asparaginasas.

Microorganismo	Número de Acceso	Longitud (a.a.)	Familia
<i>S. coelicolor</i>	Q9K4F5	348	PF06089
<i>S. varsoviensis</i>	WP_078645645.1	336	PF06089
<i>S. scabrisporus</i>	WP_078980718.1	327	PF06089
<i>S. scabrisporus</i>	WP_078979039.1	327	PF00710
<i>S. albireticuli</i>	ARZ68596.1	427	PF06089
<i>S. albireticuli</i>	WP_095584437.1	345	PF00710

Con el fin de visualizar con mayor facilidad los resultados de la predicción de la densidad de epítomos y cobertura de alelos de las ASNasas seleccionadas, estos se graficaron junto a los de la ASNasa de referencia (Figura 12). De la gráfica se observa que todas las ASNasas, incluyendo las isoenzimas añadidas al análisis, tienen una menor densidad de epítomos que EcAll; y sólo WP\_078980718.1 y WP\_095584437.1 presentan una cobertura de alelos ligeramente mayor (6 alelos, en ambos casos).

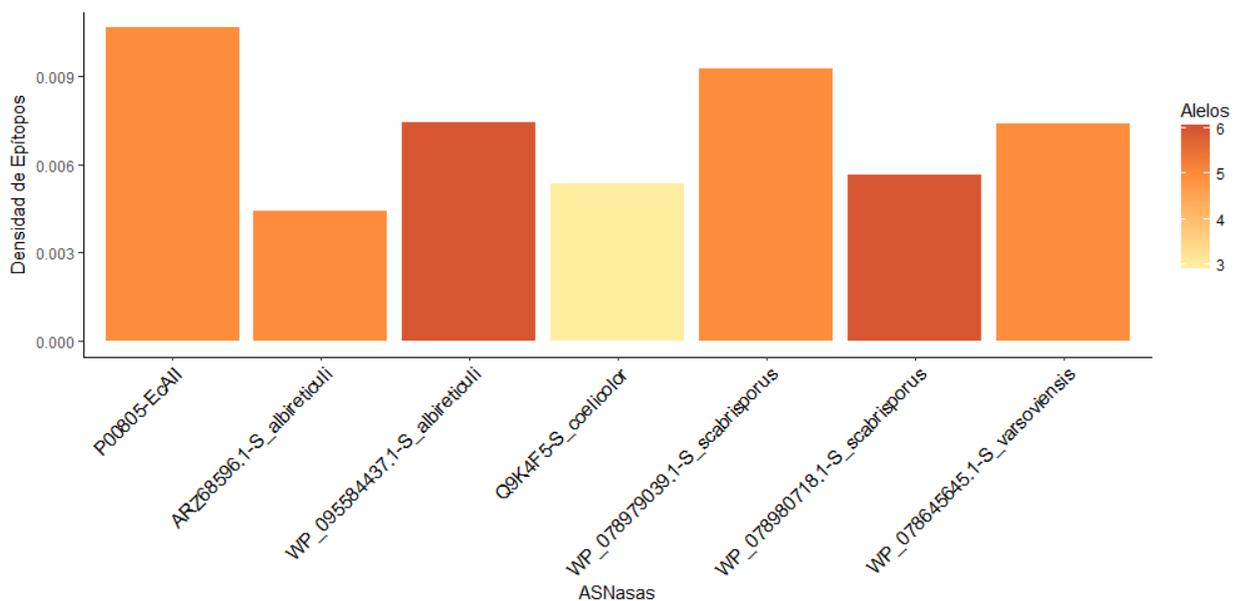
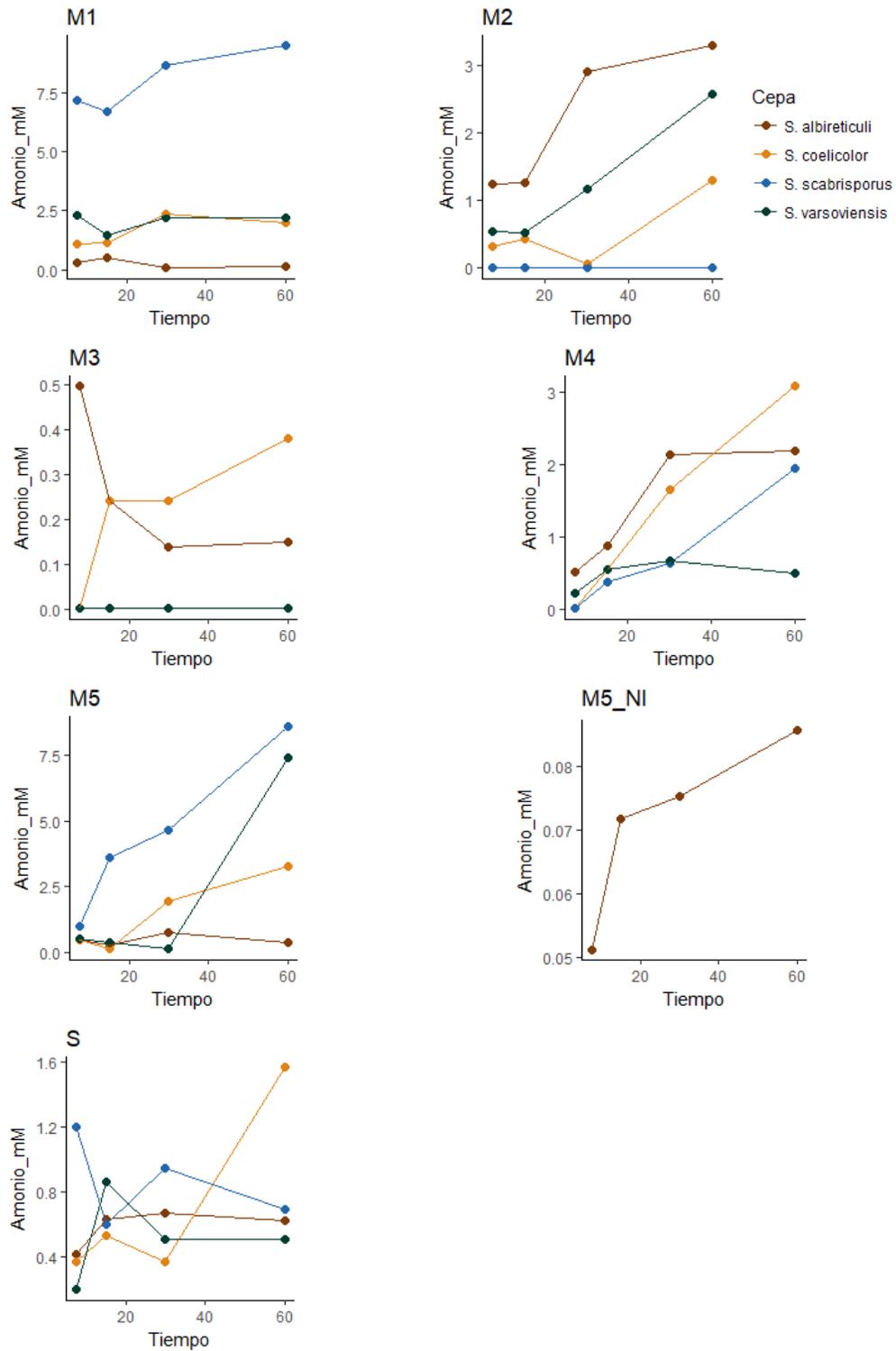


Figura 12. Densidad de epítomos y cobertura de alelos de L-Asparaginasas seleccionadas.

### 3.5. Ensayos de actividad enzimática

El cultivo de las cepas seleccionadas, en medios de cultivo con distinta composición, mostró que las diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno afectan la actividad enzimática en los extractos crudos (Figura 13). El microorganismo con mejor actividad enzimática fue *S. scabrisporus*, con 9.51 mM de amonio liberado, después de una hora de reacción, en el medio 1; la segunda mayor actividad se encontró en el medio M2, con 8.57 mM de amonio liberado. Adicionalmente, la baja actividad enzimática observada en el sobrenadante del medio M5 (en otros no hubo actividad ASNasa detectable) indica que es más probable que las ASNasas de las *Streptomyces* evaluadas sean de naturaleza intracelular. Este resultado es consistente con la predicción de carencia de péptidos señal en las secuencias de las ASNasas seleccionadas, utilizando el servidor SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).



**Figura 13.** Resultados de la evaluación de actividad enzimática a partir de distintos medios de cultivo. La composición de los medios se presenta en la Tabla 2.

### 3.6. Caracterización *in silico* de las L-Asparaginasas seleccionadas

#### 3.5.1. Modelado por homología, refinamiento y evaluación de la calidad del modelo

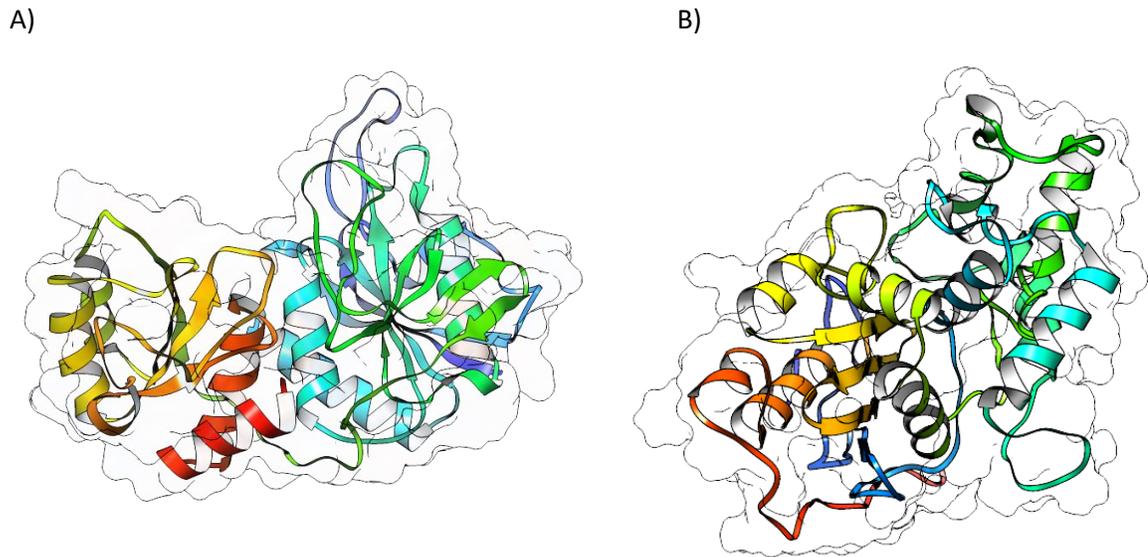
Con base en los resultados anteriores, se modelaron por homología las ASNasas putativas de *S. scabrisporus* a partir de la secuencia de aminoácidos de cada una de estas. I-Tasser genera una serie de 5 modelos, clasificados de acuerdo con su calidad por un valor-C, típicamente entre -5 y 2, siendo los modelos de mejor calidad aquellos con mayor valor-C. Para los análisis posteriores se eligió, para cada ASNasa, el modelo con el mayor valor-C. La calidad estereoquímica de los modelos se evaluó mediante gráficos de Ramachandran, los cuales muestran los ángulos de torsión phi y psi de los enlaces peptídicos entre los aminoácidos de las proteínas y permiten conocer cuántos de estos se encuentran en regiones estéricamente no permitidas. Con el fin de mejorar la calidad de los modelos, estos se refinaron estructuralmente con ModRefiner y se reevaluaron con RAMPAGE. Además, se utilizó el servidor Verify3D para determinar la compatibilidad del modelo tridimensional con su secuencia de aminoácidos; al menos 80 % de los residuos deben tener una calificación mayor o igual que 0.2. Los resultados de la evaluación de la calidad de los modelos se resumen en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Resumen de la calidad de los modelos generados con I-Tasser.

ASNasa	Valor-C [-5 a 2]	Residuos en regiones favorecidas (%)	Residuos en regiones permitidas (%)	Residuos en regiones no permitidas (%)	Verify3D (% res $\geq$ 0.2)
WP_078979039.1 – SsAII-1	1.31	94.5	4.0	1.5	93.64 / Pasa
WP_078980718.1 – SsAII-2	-3.09	91.7	5.5	2.8	80.73 / Pasa

Al observar los resultados de la evaluación de la calidad de los modelos obtenidos, es notorio que el modelo correspondiente a la ASNasa de la familia PF06089 (SsAII-2) (Figura 16) tiene una menor calidad estereoquímica que el modelo de la ASNasa de la familia PF00710 (SsAII-1) (Figura 15). Esto, como ha señalado Roy et al., (2011), se debe a la falta de homólogos cercanos en la librería usada por I-Tasser. Además, debido a que I-Tasser construye los modelos a partir de reensamblar fragmentos construidos a partir de múltiples moldes. Como resultado, modelos que no tienen homólogos cercanos presentan más ángulos de torsión en regiones energéticamente no favorables y esto puede ser observado en los gráficos de Ramachandran.

Para WP\_078979039.1 (SsAll-1), se encontraron los residuos Asn 27, Thr 30, Pro 195, Thr 198 y Asp 223 en regiones no permitidas. En tanto que para WP\_078980718.1 (SsAll-2), se encontraron los residuos Ala 19, Glu 47, Pro 75, Cys 114, Pro 115, Arg 118, Val 191 e His 231 en regiones no permitidas.



**Figura 14.** Estructura 3D de las L-Asparagininas seleccionadas, modeladas por homología con I-Tasser. A) WP\_078979039.1 y B) WP\_078980718.1.

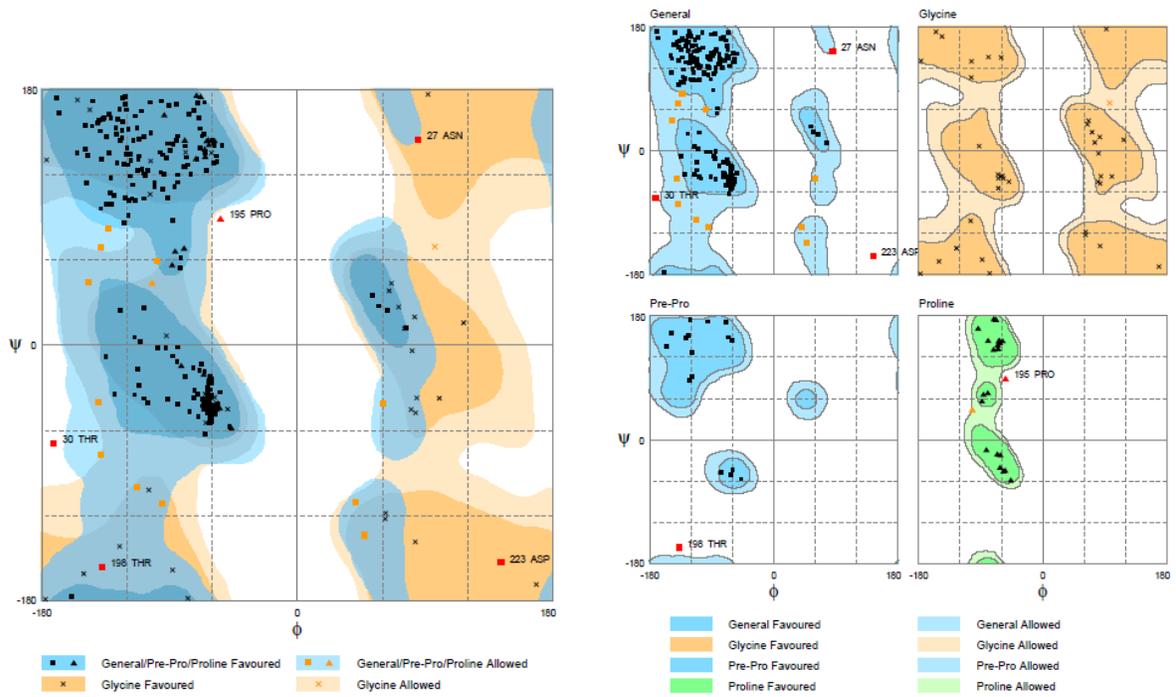


Figura 15. Gráfico de Ramachandran para los residuos de la ASNasa WP\_078979039.1.

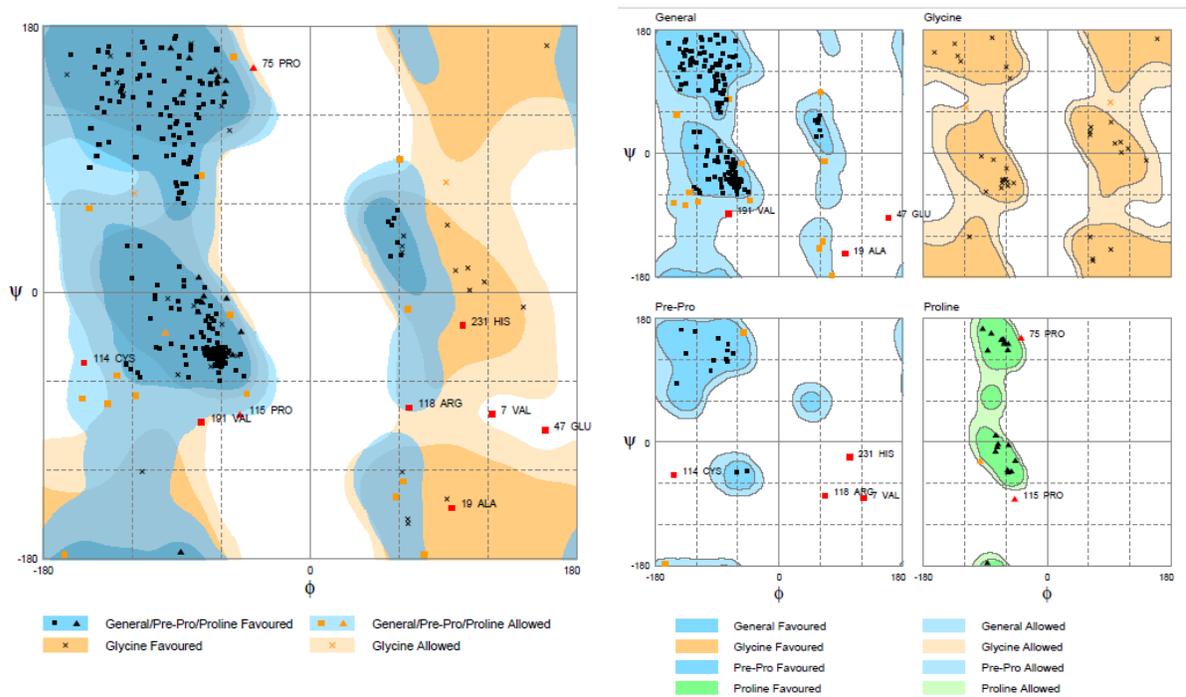


Figura 16. Gráfico de Ramachandran para los residuos de la ASNasa WP\_078980718.1

Además de modelar la estructura tridimensional de las proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos, I-Tasser utiliza otros algoritmos para la anotación funcional de estas, con base en la estructura predicha. De acuerdo con esto, la ASNasa WP\_0789718.1 (familia PF06089) está, en términos de plegamiento, relacionada con la familia de las beta-lactamasas. De acuerdo con la base de datos SCOP, estructuralmente, las beta lactamasas (entrada 56600) están constituidas por un clúster de hélices alfa y un 'sándwich' alfa/beta; este plegamiento también se encuentra en las transpeptidasas, esterases, receptores de penicilina, D-aminopeptidasas y glutaminasas (InterPro IPR012338). Por otro lado, WP\_078979039.1 (familia PF00710) presenta un plegamiento que corresponde a la familia de las Asparaginasas/Glutaminasas: un dominio mixto de láminas beta de 6 hebras (la hebra 6 es antiparalela) y un dominio de láminas beta de 4 hebras paralelas. De acuerdo con la base de datos SCOP (número de acceso 53773), este tipo de plegamiento es común en las ASNasas tipo II (clasificación en función de las ASNasas de *E. coli*), glutaminasas-asparaginasas y en la subunidad D de las glutamil-tRNA amidotransferasas.

### 3.5.2. Predicción del sitio activo

Para identificar los posibles residuos que componen el sitio activo de las ASNasas modeladas, se utilizaron tres enfoques: comparación genómica, simulación de acoplamiento molecular 'ciego' y búsqueda de bolsillos (pockets) de unión de alta afinidad con AutoLigand.

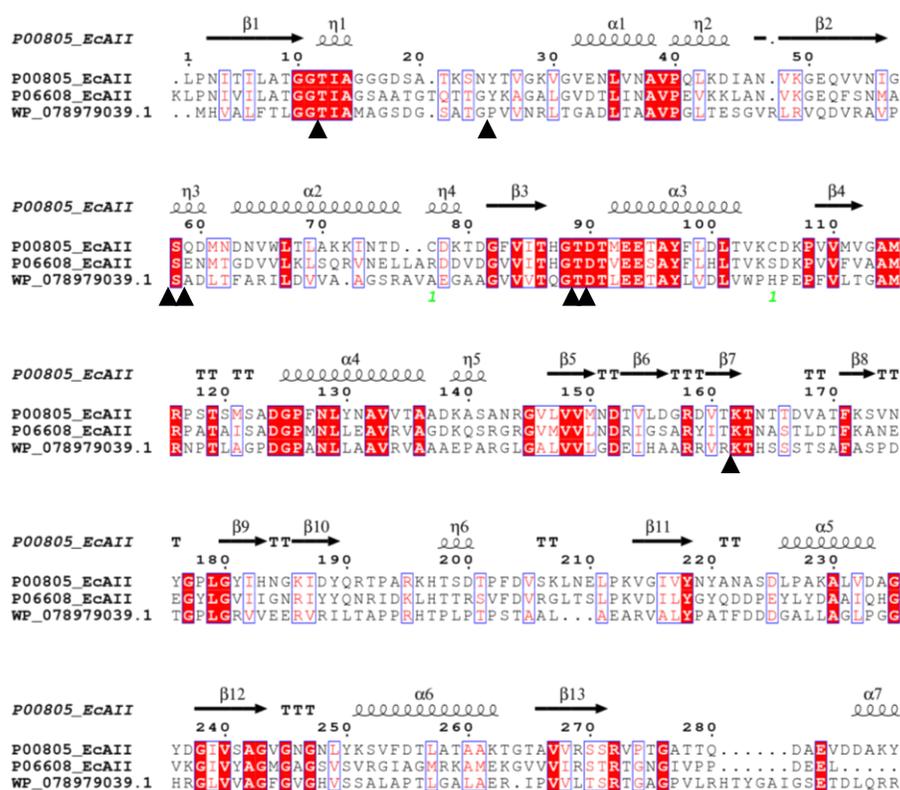
La comparación de la ASNasa WP\_078979039.1 con las ASNasas tipo de II de *E. coli* y *E. chrysanthemi* (EcAll) mostró que las treoninas catalíticas Thr 11 y Thr 90 (Thr 12 y Thr 89, de acuerdo con la numeración en EcAll), y los residuos Ser 58, Asp 91 y Lys 162 están conservados en la ASNasa seleccionada. Por otro lado, se observa un cambio de una tirosina (25) por el residuo prolina (24), glutamina (59) por alanina (59) y asparagina (248) por histidina (246) con respecto a EcAll (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Asimismo, al superponer las estructuras de EcAll y la ASNasa seleccionada de *S. scabrisporus* (WP\_078979039.1 – SsAll-1), mediante un alineamiento estructural, se observa que el sitio catalítico está conservado (RMSD = 1.112); sólo se observa la sustitución de los residuos Tyr 25 y Gln 59 de EcAll por Pro 24 y Ala 59 de SsAll-1 (Figura 18).

Por otra parte, a la fecha no existe información referente a las características del sitio activo de las ASNasas de la familia PF06089, por lo que la comparación genómica con alguna ASNasa de la familia no es posible. Utilizando AutoLigand se identificaron dos posibles sitios de unión (

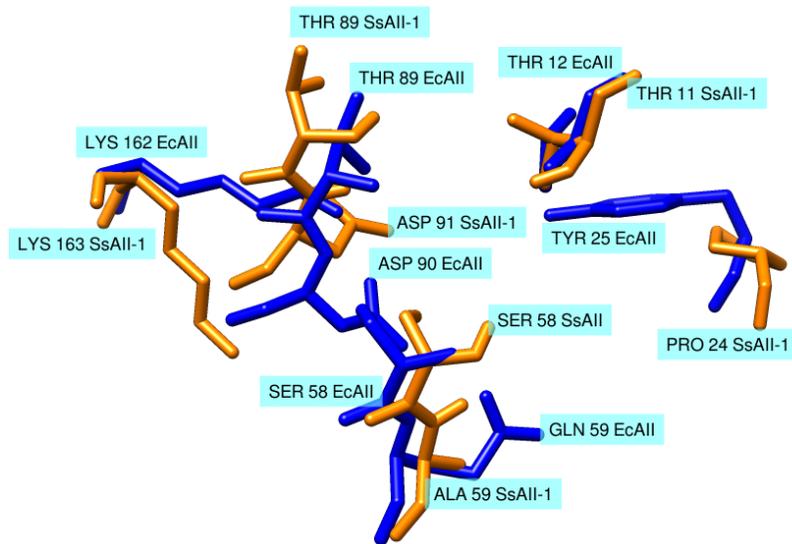
Figura 19) a partir del mínimo que se observa en la curva de energía contra volumen (cuadros rojos). El primero (sitio A), con un volumen de  $121 \text{ \AA}^3$  y una energía por volumen igual a  $-0.2149$ ; el segundo (sitio B), con un volumen de  $101 \text{ \AA}^3$  y una energía por volumen igual a  $-0.2136$ . El sitio A se localiza entre una alfa hélice en el amino terminal, del que forma parte el motivo PRSx(2)KPxQ y un loop en la región central de la enzima, del que forma parte el motivo NCSGKHxAM. Mientras que el sitio B se localiza entre en un pocket formado por un conjunto de alfa hélices en el amino terminal de la proteína, marcado por la presencia del motivo SHSGEx(2)H. En tanto que utilizando AutoDock 4.2 para realizar simulaciones de acoplamiento molecular sobre toda la proteína se encontró que la mejor pose del ligando, con una energía libre de unión de  $-4.17 \text{ kcal/mol}$ , interactúa con residuos correspondientes al motivo NCSGKHxAM (Tabla 9, Figura 20)

**Tabla 9.** Residuos de los probables sitios de unión en SsAII-2. En negritas se muestran los residuos que pertenecen a algún motivo conservado en la familia PF06089.

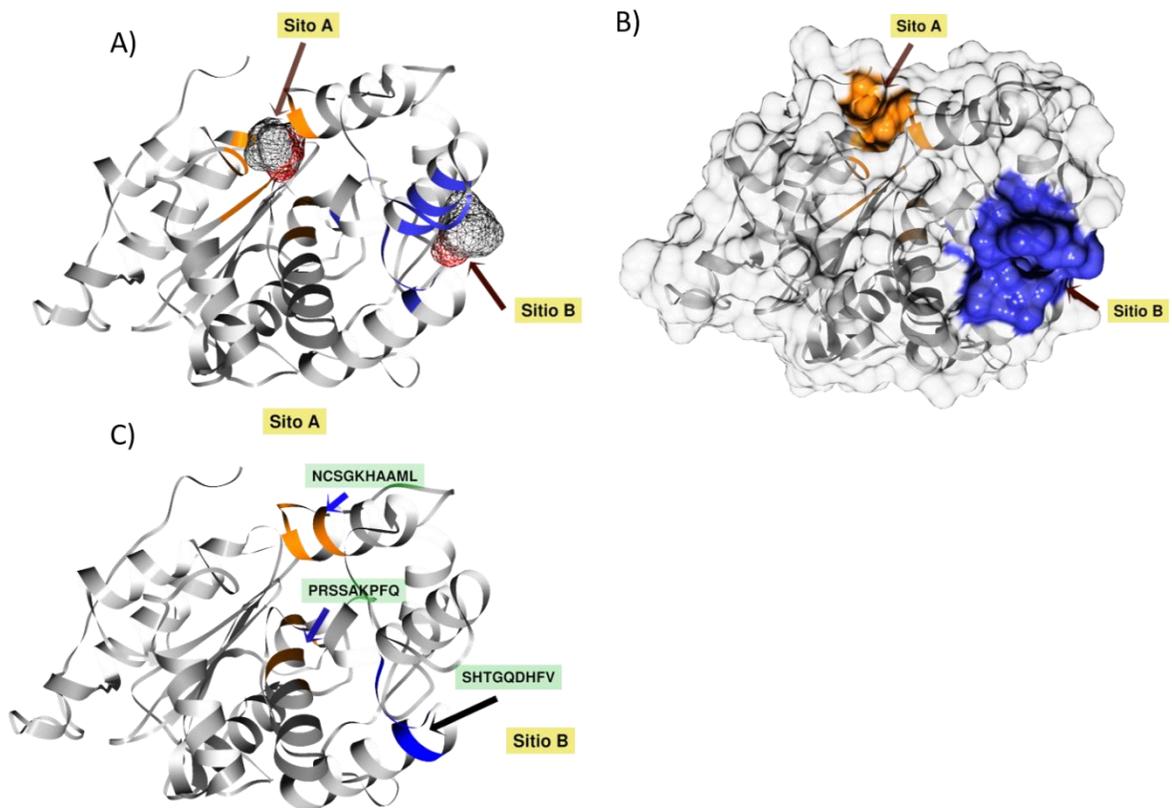
Sitio	AutoLigand	Acomplamiento molecular ciego
A	Arg 58, Ser 59, Lys 62, <b>Asn 141, Ser 143, Gly 144, Lys 145, His 146, Ala 147</b> , Gly 236, Gly 237, Asp 238, Gly 239, Lys 255, Gly 256, Gly 257, Ala 258, Pro 281, Leu 326	Asn 135, Thr 136, Arg 137, Arg 139, <b>Asn 141, Gly 144, His 146</b> , Asp 192
B	Ala 85, Gly 86, <b>Ser 87, His 88, Thr 89, Gly 90, Gln 91, His 94</b> , Leu 164, Asp 165, Pro 166, Gly 167, His 168, Leu 173, Glu 177, Gly 178, Asp 180	-



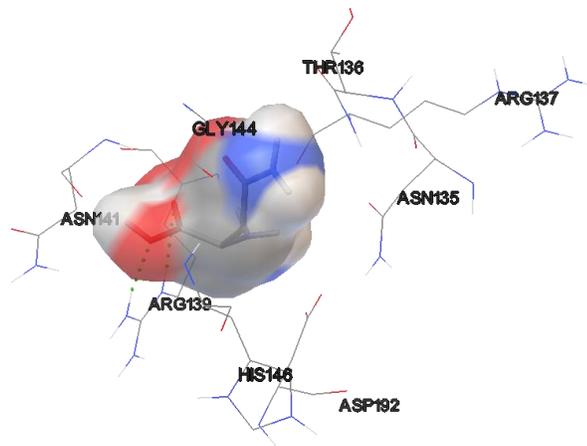
**Figura 17.** Alineamiento múltiple de secuencias de EcAII, ErAII y SsAII-1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las 2 ASNasas mejor caracterizadas con la ASNasa candidata WP\_078979039.1 (SsAII-1) de *S. scabrisporus*.



**Figura 18.** Alineamiento estructural de las L-Asparaginases EcAII y SsAII-1. En color azul se muestran los residuos del sitio activo de EcAII; en dorado, los del sitio catalítico de SsAII-1.

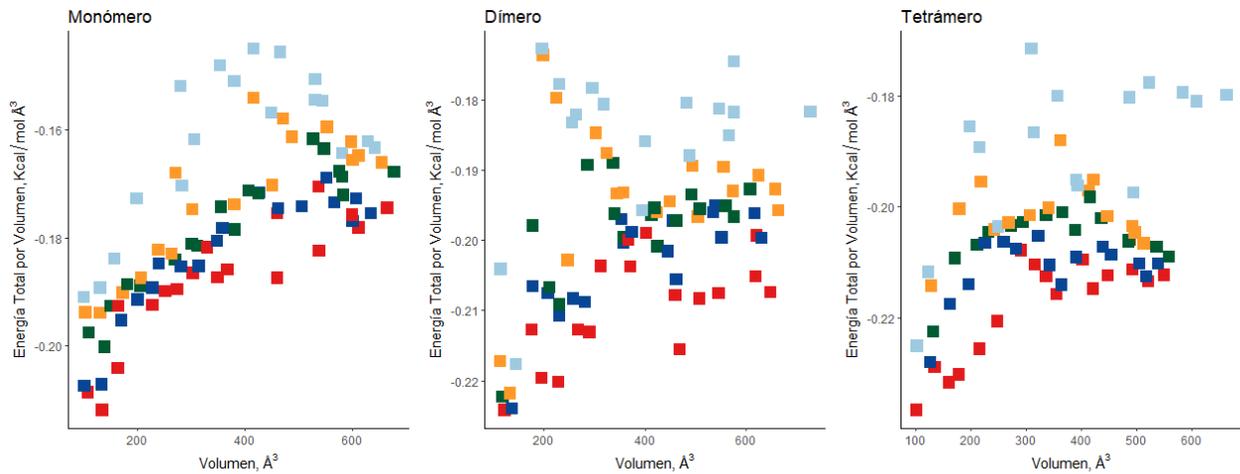


**Figura 19.** Sitios putativos encontrados con AutoLigand para la SsAII-2. En color naranja se muestran las partes de la estructura en un radio de 5 Å del sitio A y en color azul aquellas a 5 Å del sitio B encontrado con AutoLigand utilizando volúmenes de llenado desde 20 a 200 puntos. A) Superficie molecular de las soluciones encontradas con AutoLigand; B) Superficie molecular de SsAII-2; C) Motivos que forman parte de los sitios putativos encontrados.

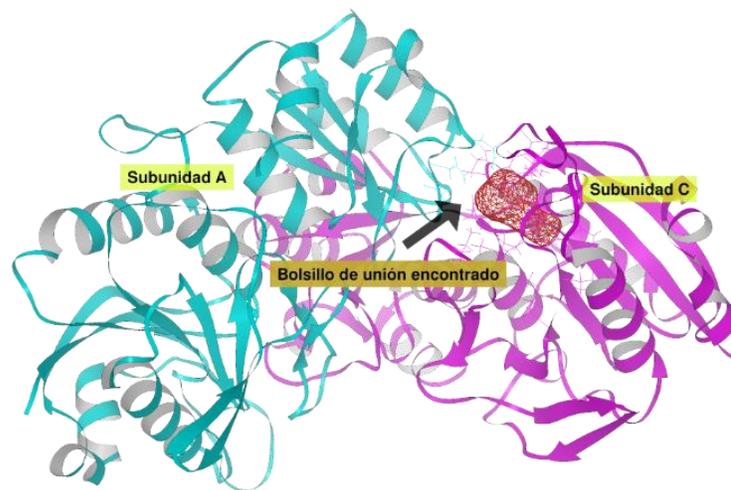


**Figura 20.** Residuos en contacto cercano con la L-asparagina, encontrados mediante acoplamiento molecular ciego.

Adicionalmente, con el fin de validar el uso de AutoLigand para encontrar los sitios putativos en las ASNasas de *S. scabrissporus*, se realizó una búsqueda de sitios de unión en la ASNasa tipo II de *E. coli*. Para esto, se analizaron la forma monomérica, dimerica y tetramérica de la enzima (esta última, la forma catalíticamente activa) utilizando las mismas condiciones que se usaron para SsAII-2. Se encontró que para las tres formas analizadas, AutoLigand identificó con éxito el sitio de unión de la L-asn, formado por los residuos Thr 12, Tyr 25, Ser 58, Gln 59, Thr 89, Asp 90 y Lys 162, Asn 248 y Glu 283 (Figur9a 22), estos dos últimos sólo para las formas dimerica y tetramérica. Los sitios encontrados (curva marcada por los cuadros rojos en la Figura 21) tienen una energía por volumen igual a -0.2119, -0.2242 y -0.2366 kcal/mol Å<sup>3</sup> y un volumen de 136, 122 y 102 Å<sup>3</sup> para el monómero, dímero y tetrámero, respectivamente (Figura 21). Es relevante mencionar que tanto para la forma dimerica, como para el tetrámero, AutoLigand identificó con éxito todos los bolsillos de unión de L-asn en EcAII: el bolsillo formado entre el extremo amino terminal de la subunidad A y el carboxilo terminal de la subunidad que completa el dímero, la subunidad C, así como los bolsillos equivalentes para el dímero BD. Además, varias de las soluciones encontradas por AutoLigand (curva con cuadros azules), utilizando hasta 90 puntos de llenado, convergen en los diferentes bolsillos de unión formados por los dímeros. Más allá, otras de las soluciones (cuadros verdes) encontradas corresponden a la interfase entre las subunidades de los dímeros.



**Figura 21.** Resultados de AutoLigand para EcAII. Los mínimos observados en las gráficas de energía total por unidad de volumen representan sitios de unión putativos en las estructuras analizadas. A medida que se utilizan más puntos de llenado, los sitios de unión, cavidades o surcos van siendo llenados y la afinidad disminuye. Los mejores sitios son los de menor energía y menor volumen.



**Figur9a 22.** Bolsillo de unión encontrado para el dímero de EcAII. En color cian se muestra la subunidad C; en color magenta, la subunidad A de la ASNasa tipo II de *E. coli*. Se muestran solamente las subunidades A y C de la ASNasa en su forma dimérica. El enmallado en color rojo representa el bolsillo de más alta afinidad encontrado por AutoLigand. El sitio representado en el esquema corresponde a los residuos localizados a una distancia máxima de 5 Å del centro de la solución encontrada usando 20 puntos: Thr 12, Tyr 25, Ser 58, Gln 59, Thr 89 y Asp 90 de la subunidad C y Asn 248 y Glu 283 de la subunidad A.

### 3.7. Simulación de Acoplamiento Molecular

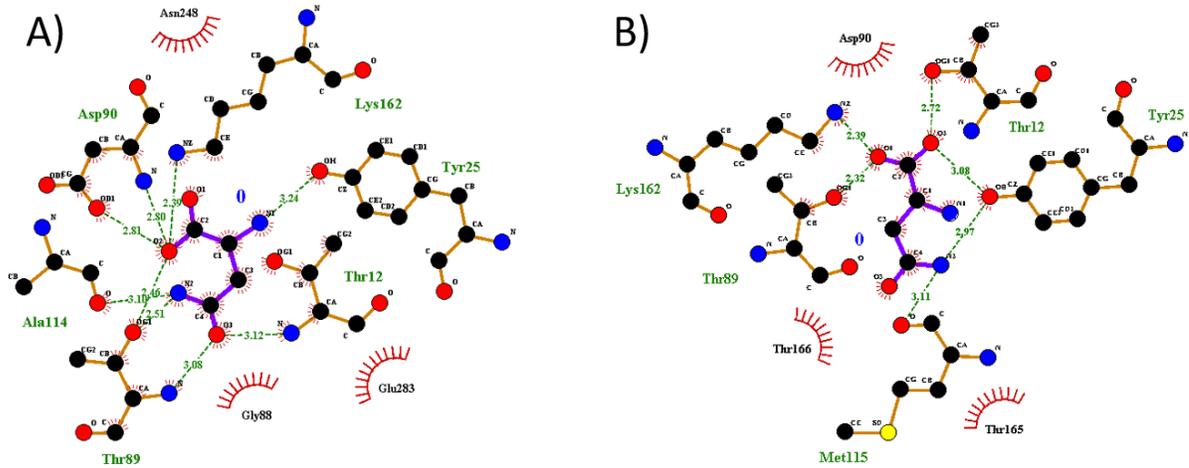
Se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular en los sitios putativos encontrados. Los resultados indican que SsAII-2 tiene mayor afinidad que SsAII-1 por la L-asparagina, pero menor afinidad que EcAII (Tabla 10). Para EcAII, la ASNasa de referencia, se establecieron como residuos flexibles Thr 12, Tyr 25, Ser 58, Gln 59, Thr 89, Asp 90, Asn 248 y Glu 283; en tanto que para los acoplamientos moleculares para SsAII-1 y SsAII-2 se realizaron utilizando la estructura rígida de la proteína, esto es, sin definir cadenas laterales flexibles como una exploración simplificada del modo de unión de la L-asparagina.

**Tabla 10.** Resultados de los acoplamientos moleculares.

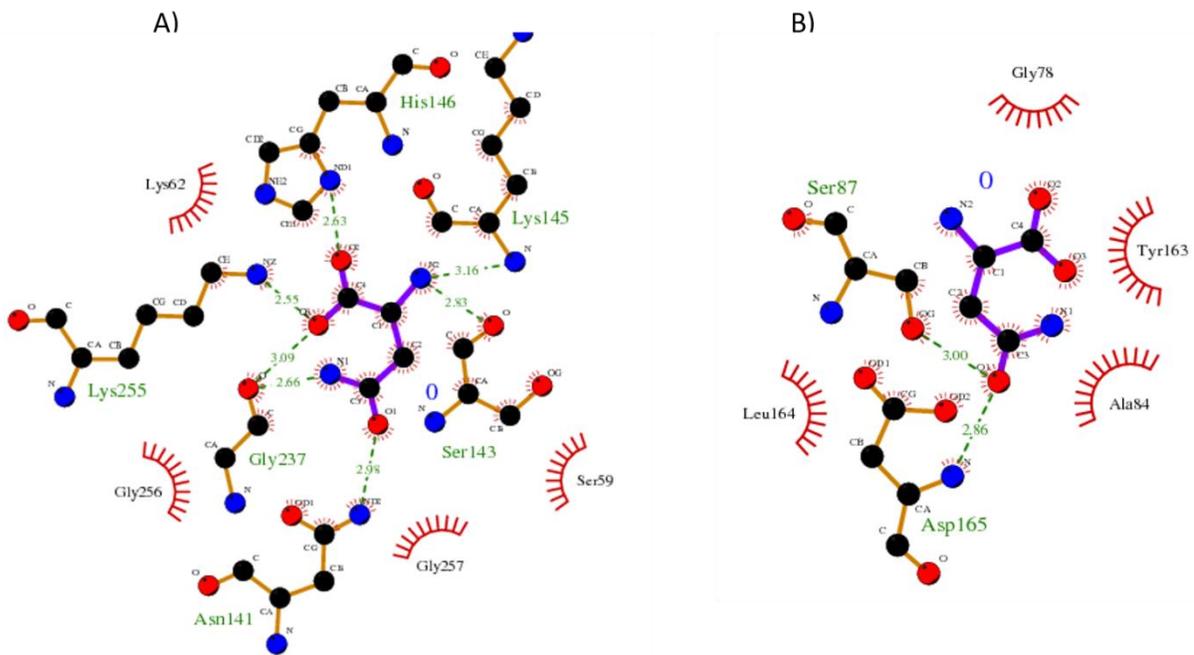
ASNasa	Energía libre de unión (kcal/mol)	Energía intermolecular (kcal/mol)	van der Waals – enlaces de hidrógeno (kcal/mol)	Energía electrostática (kcal/mol)	Enlaces de Hidrógeno
EcAII; 3eca:ABCD	-9.81	-11.30	-5.88	-3.61	9
EcAII, 3eca:A	-8.46	-9.95	-7.02	-2.35	6
WP_078979039.1	-6.06	-7.55	-4.17	-2.04	4
WP_078980718.1 – Sitio A	-6.67	-8.17	-5.25	-2.91	6
WP_078980718.1 – Sitio B	-4.62	-6.11	-4.39	-1.72	2

Los resultados muestran una mayor afinidad de la ASNasa SsAII-2, en el sitio A, por la L-asparagina que el sitio B y que SsAII-1. Sin embargo, menor afinidad de SsAII-2 A que la L-asparaginasa de *E. coli*. Para SsAII-1, se encontró que el ligando interactúa con los residuos Thr 11, Gly 89, Thr 90, Asp 91, Ala 115 y Met 116.

Para el sitio A de SsAII-2, los resultados muestran que la L-asparagina interactúa con los residuos Ser 59, Lys 62, Asn 141, Ser 143, Lys 145, His 146, Gly 237, Lys 255, Gly 256 (Figura 24 A). En tanto que, para el sitio, los residuos que interactúan con la L-asparagina son Ala 84, Gly 78, Ser 87, Tyr 163, Leu 164 y Asp165 (Figura 24 B). Del sitio A, Lys 62, ASN 141, Ser 143, Lys 145 e His 146 están altamente conservados en las proteínas de la familia PF06089, mientras que, del sitio B, solamente Ser 87 forma parte de un motivo característico de la familia.



**Figura 23.** Mapa de interacciones entre EcAII y la L-asparagina. Se muestran las interacciones entre las subunidades A y C de la forma tetramérica con la L-asparagina (A) y las interacciones para el monómero (B).



**Figura 24.** Mapas de interacciones para los sitios A y B de la L-asparaginasa SsAII-2. Las esferas color negro representan átomos de Carbono, las azules Nitrógeno y las rojas Oxígeno. Los enlaces de hidrógeno están representados por líneas punteadas de color y las medias luna color rojo representan interacciones hidrofóbicas.

## Capítulo 4. Discusión

---

En este trabajo se usaron un conjunto de herramientas bioinformáticas para identificar, seleccionar y caracterizar probables ASNasas de microorganismos del género *Streptomyces*. La identificación de las probables ASNasas se llevó a cabo con base en la búsqueda de secuencias homólogas a las ASNasas tipo II de *Escherichia coli* (EcAII) y de *Streptomyces coelicolor* (ScAII). La primera, la L-asparaginasa mejor caracterizada y más ampliamente utilizada para el tratamiento de la LLA, mientras que ScAII es una proteína homóloga a la ASNasa tipo II de *Rhizobium etli* (ReAII), una ASNasa atípica con nula actividad glutaminasa y con, probablemente, un perfil inmunogénico distinto EcAII. A partir de las referencias definidas, la búsqueda de secuencias homólogas se limitó al grupo de los *Streptomyces* y dio como resultado dos conjuntos de secuencias con alta probabilidad de ser ASNasas (Valor E < 1e-06). Estos conjuntos de secuencias, a su vez, se clasificaron en dos familias distintas de proteínas en función del análisis de homología utilizando HMMER: PF00710 y PF06089, de acuerdo con la clasificación de la base de datos PFAM. Hasta ahora, la mayoría de las ASNasas reportadas pertenecen a la familia PF00710 y han sido ampliamente estudiadas. A esta familia pertenecen la ASNasa tipo de *E. coli* y de *Erwinia chrysanthemi*. Por otra parte, la familia PF06089 representa una familia de ASNasas atípicas y existe poca información que amplíe el conocimiento de la misma: hasta ahora, los trabajos más representativos publicados acerca estas ASNasas incluyen la caracterización del operón que controla la expresión de la ASNasa tipo II de *R. etli* -inducible con L-asparagina- (Ortuño-Olea y Vargas-Durán, 2000) y la caracterización bioquímica de la misma (Moreno-Enríquez et al, 2012; Huerta-Saquero et al, 2013).

Posterior a la selección e identificación de los dos primeros conjuntos de ASNasas, la elección de la densidad de epítomos de células T como indicador de la potencial inmunogenicidad y como punto de comparación para seleccionar las mejores candidatas, obedece al hecho de que, como han señalado Cantor et al., (2004), Fernández et al., (2012) y Galindo-Rodríguez et al., (2017), las moléculas del HLA clase II tienen un papel crítico en el desarrollo de anticuerpos específicos anti ASNasa y de hipersensibilidad; asimismo haplotipos particulares como HLA-DRB1\*04:01 y HLA-DRB1\*07:01 están relacionados con una mayor incidencia de reacciones alérgicas. Adicionalmente, se ha demostrado que las proteínas que son altamente inmunogénicas generalmente contienen una mayor cantidad de epítomos de células T, o clústeres de estos, que las que lo son en menor medida (Singh et al., 2012); más allá de esto, la medición y predicción de la densidad de epítomos ha generado interés como una herramienta útil para la comparación entre proteínas terapéuticas. Esto, con el fin de comparar diferentes versiones de una proteína dada y seleccionar la mejor candidata en términos de inmunogenicidad (De Groot y Martin, 2009).

En este sentido, los resultados mostraron que las ASNasas de la familia PF06089 contienen, tentativamente, menor densidad de epítomos que las isoenzimas de la familia PF00710, así como una menor presencia de clústeres de epítomos a lo largo de la secuencia. Además, la evaluación de la cobertura de alelos -relacionada con el porcentaje de la población que desarrolla una respuesta inmunológica significativa- mostró que las ASNasas de *Streptomyces* son, potencialmente, una opción farmacológica interesante. En otras palabras, debido a su bajo contenido de epítomos de células T, baja probabilidad de antigenicidad y baja cobertura de alelos, las ASNasas de *Streptomyces* representan, en términos de inmunogenicidad, una alternativa farmacológica para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda. En este sentido, El-naggar et al., (2018) demostraron que la ASNasa de *Streptomyces brollosae* NEAE-115 tiene un mejor perfil citotóxico e inmunogénico, evaluado en un modelo murino, que la ASNasa tipo II de *E. coli* para el tratamiento de la LLA. Anteriormente, El-Naggar et al., (2016) habían mostrado evidencia de la capacidad anticancerígena frente al cáncer de colon, en un cultivo *in vitro*, de la ASNasa de *Streptomyces fradiae* NEAE-82.

Por otro lado, a partir la selección de las ASNasas con el mejor perfil inmunogénico se adquirieron, de la colección de cepas ARS, las *Streptomyces* que las producen: *S. albireticuli*, *S. coelicolor*, *S. varsoviensis* y *S. scabrissporus*. Se mostró que la composición del medio de cultivo influye fuertemente en la actividad enzimática de los extractos crudos, aunque la elección del medio de cultivo adecuado para la producción de ASNasas depende, en gran medida, de la especie de *Streptomyces*, aunque en general, se ha reportado que el almidón, la maltosa (fuentes de carbono) y el extracto de levadura (fuente de nitrógeno) adecuadas para la producción de la enzima (Mangamuri et al., 2017; Meena et al., 2015; Narayana et al., 2008). Interesantemente, el medio de cultivo M1, con L-asparagina (0.5%) como única fuente de carbono y con sulfato de amonio (20 mM) como fuente de nitrógeno, mostró ser un medio de cultivo adecuado para la producción de ASNasas de *S. scabrissporus*, en comparación con *S. albireticuli*, *S. coelicolor* y *S. varsoviensis*. No obstante, este resultado particular debe ser tomado con cautela debido a la posible presencia del ion que pudiera estar presente en el medio. Asimismo, se obtuvo una actividad enzimática similar para *S. scabrissporus* utilizando el medio de cultivo M5, con extracto de malta como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Además, las diferencias observadas en los extractos enzimáticos inducido (con L-asparagina) y sin inducir, de *S. scabrissporus*, en cuanto a actividad enzimática y perfil de proteínas en el gel de poliacrilamida, indican la probable presencia de una ASNasa. Sin embargo, no es posible concluir de cuál de las dos isoenzimas se trata, lo que hace necesario diseñar una estrategia experimental que permita confirmar o descartar la presencia de las ASNasas predichas.

La comparación directa de la ASNasa SsAII-1 (WP\_078979039.1) con EcAII mostró una alta conservación a nivel secuencia y estructura. Sin embargo, el sitio activo de SsAII-1 mostró tener menos afinidad por la L-asparagina que EcAII. Esto podría ser explicado, en parte, por la sustitución de una tirosina por una prolina en el sitio activo (EcAII:Tyr 25 → SsAII-1: Pro24). Además de brindar estabilidad, la tirosina aporta un grupo hidroxilo necesario para llevar a cabo la reacción hidrolítica (Derst et al., 1994)

En cuanto a las ASNasas de la familia PF06089, la falta de información acerca de las características del sitio activo impide la comparación directa, como en el enfoque usado para la ASNasa WP\_078979039.1. No obstante, el uso de herramientas computacionales basadas en la inspección de la estructura y los enfoques basados en la evaluación de los mapas de afinidad han mostrado ser altamente efectivos para identificar probables sitios de unión en proteínas no caracterizadas (Harris et al., 2008). Con base en el uso de diversas herramientas computacionales, que utilizan diferentes métodos, se logró identificar dos posibles sitios de unión en SsAII-2 (WP\_078980718.1). Interesantemente, en ambos sitios se identificaron los motivos NCSGKHxAM, PRSx(2)KPxQ y SHSGEx(2)H, los cuales están altamente conservados en la familia PF06089 (Huerta-Saquero et al., 2012). De estos, Borek et al (2001) han propuesto que algunos de los residuos del motivo NCSGKHxAM, podrían estar implicados en la desamidación hidrolítica de la L-asparagina debido a su alta conservación en la familia PF06089. Aunque el sitio A mostró mejores condiciones para la unión de la L-asparagina, son necesarios estudios adicionales para confirmar cuál es el mejor sitio para la unión del ligando. Adicionalmente, simulaciones de dinámicas moleculares pueden aportar más evidencia de las características del sitio de unión y, junto con estudios *in vitro*, son útiles para entender mecanismo de reacción (Karplus y Kuriyan, 2005).

Finalmente, estos resultados deben ser tomados con cautela, pues más análisis son necesarios para validarlos.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

El enfoque utilizado, basado en la búsqueda de secuencias homólogas a la ASNasa tipo II de *E. coli* y *S. coelicolor*, permitió identificar probables L-asparaginidas de *Streptomyces* de dos familias diferentes de proteínas: PF00710 y PF06089.

Se calculó la probabilidad de antigenicidad, contenido de epítomos de células T, densidad de epítomos de células T y cobertura de alelos de las L-asparaginidas seleccionadas para seleccionar las mejores candidatas y se compararon con la ASNasa tipo II de *Escherichia coli* por ser la enzima más usada para el tratamiento de la LLA. Con base en lo anterior, se adquirieron, de la colección de microorganismos ARS, las especies *S. albireticuli*, *S. coelicolor*, *S. varsoviensis* y *S. scabrisporus*.

Se probaron diferentes medios de cultivo, con distintas fuentes de carbono y nitrógeno, para comparar la actividad L-asparaginasa de los extractos crudos y de los sobrenadantes de las *Streptomyces* seleccionadas. Se obtuvo mayor actividad enzimática para *S. scabrisporus* creciendo en medio mineral suplementado con L-asparagina (0.5%), extracto de malta (0.5%) y extracto de levadura (0.5%).

Se obtuvieron modelos estructurales de las L-asparaginidas putativas de *S. scabrisporus*, utilizando el servidor I-Tasser para modelarlas por homología. Se obtuvo un modelo de alta calidad para la ASNasa con número de acceso WP\_078979039.1 (SsAII-1). Sin embargo, para la ASNasa WP\_078980718.1 (SsAII-2) se obtuvo un modelo de menor calidad debido a la falta de estructuras homólogas en la base de datos de proteínas. La resolución experimental de la estructura cristalográfica de esta L-asparaginida es una perspectiva interesante para la validación de los resultados obtenidos *in silico*.

Por último, se propusieron dos probables sitios activos para SsAII-2. Esto, a partir del análisis de la estructura tridimensional predicha y utilizando herramientas basadas en diferentes enfoques, como la evaluación de los mapas de afinidad con AutoLigand y la simulación del acoplamiento molecular de la L-asparagina usando AutoDock 4.2. Los sitios encontrados muestran alta conservación -a nivel de la estructura primaria- en las L-asparaginidas de la familia PF06089.

## Perspectivas

---

Como perspectiva de este trabajo se propone la clonación de las L-asparaginidas de *Streptomyces scabrissporus*, su secuenciación para confirmar la similitud con la secuencia depositada en la base de datos, su caracterización bioquímica y la resolución de su estructura tridimensional. Asimismo, la obtención de la enzima permitiría evaluar su toxicidad en modelos *in vitro* e, idealmente, *in vivo*.

Se plantea, además, realizar mutaciones puntuales para cambiar los residuos que componen los sitios putativos propuestos. Particularmente, las serinas en las posiciones 87 y 143, por su alta capacidad para funcionar como nucleófilos, análogos a la treonina catalítica de la L-asparaginida de *Escherichia coli* –y de las ASNasas de la familia PF00710–.

Adicionalmente, estudios de dinámicas moleculares pueden aportar nuevos datos que permitan identificar con una mayor confianza los posibles residuos del sitio activo, así como el probable mecanismo de acción de la reacción de desamidación que llevaría a cabo una L-asparaginida novedosa, de una familia poco estudiada.

## Literatura Citada

---

- Ali, U., Naveed, M., Ullah, A., Ali, K., Shah, S. A., Fahad, S., y Mumtaz, A. S. (2016). L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. *European Journal of Pharmacology*, 771, 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.023>
- Barba, P., Dapena, J. L., Montesinos, P., y Rives, S. (2017). Asparaginasas en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Clínica*, 148(5), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.12.006>
- Borek, D., y Jaskólski, M. (2001). Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica*, 48(4), 893–902.
- Chan, W. K., Lorenzi, P. L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D. M., Sukharev, S., ... Weinstein, J. N. (2017). The glutaminase activity of L -asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood*, 123(23), 3596–3607. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-535112.W.K.C>
- Correia da Silva, R., Santos Siqueira, A., Ranieri Jerônimo Lima, A., de Melo Lima, A., Silva Santos, A., Cristina Figueira Aguiar, D., y Costa Gonçalves, E. (2018). In silico characterization of a cyanobacterial plant-type isoaspartyl aminopeptidase/asparaginase. <https://doi.org/10.1007/s00894-018-3635-6>
- Crooks, G., Hon, G., Chandonia, J., y Brenner, S. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, 14, 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004.1>
- Derst, C., Wehner, A., Specht, V., y Röhm, K. -H. (1994). States and Functions of Tyrosine Residues in Escherichia coli Asparaginase II. *European Journal of Biochemistry*, 224(2), 533–540. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00533.x>
- Eisenberg, D., Luthy, R., y U. Bowie, J. (1997). V E R I F Y 3 D : Assessment of Protein Models with Three-Dimensional Profiles. *Methods in Enzymology*, 277, 396–404. Retrieved from [http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/prot.10286/asset/10286\\_ftp.pdf?v=1yt=gwhx9jy0ys=b3b0f129a5acf7f4513aea04d22aad7ee4f4a89d](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/prot.10286/asset/10286_ftp.pdf?v=1yt=gwhx9jy0ys=b3b0f129a5acf7f4513aea04d22aad7ee4f4a89d)
- El-Naggar, N. E.-A., Deraz, S. F., Soliman, H. M., El-Deeb, N. M., y El-Ewasy, S. M. (2016). Purification, characterization, cytotoxicity and anticancer activities of L-asparaginase, anti-colon cancer protein, from the newly isolated alkaliphilic Streptomyces fradiae NEAE-82. *Scientific Reports*, 6(1), 32926. <https://doi.org/10.1038/srep32926>
- El-naggar, N. E., Deraz, S. F., El-ewasy, S. M., y Suddek, G. M. (2018). Purification , characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from Streptomyces brollosae NEAE-115, 1–15.
- Emadi, A., Zokaee, H., y Sausville, E. A. (2014). Asparaginase in the treatment of non-ALL hematologic malignancies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 73(5), 875–883. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2402-3>
- Fernández, M., y Zúñiga, M. (2006). Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(3), 155–183. <https://doi.org/10.1080/10408410600880643>
- Gasteiger, J., y Marsili, M. (1978). A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Letters*, 19(34), 3181–3184. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)94977-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)94977-9)
- Hijiya, N., y van der Sluis, I. M. (2015). Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia y Lymphoma* (Vol. 8194).

<https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1101098>

- Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L., y Li, W. (2010). CD-HIT Suite: A web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics*, 26(5), 680–682. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq003>
- Huerta-Saquero, A., Evangelista-Martínez, Z., Angélica, M. E., y Perez-Rueda, E. (2013). Rhizobium etli asparaginase II: an alternative for acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment. *Bioengineered*, 4(February), 1–7. <https://doi.org/10.1128/JB.00714-13>
- Kumar, K., Kaur, J., Walia, S., Patnak, T., y Aggarwal, D. (2013). L-asparaginase: an effective agent in the treatment of acute Lymphoblastic Leukemia (All). *Leukemia y Lymphoma*.
- Lanvers-Kaminsky, C. (2017). Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 0(0), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3236-y>
- Lopes, A. M., Oliveira-Nascimento, L. de, Ribeiro, A., Tairum, C. A., Breyer, C. A., Oliveira, M. A. de, ... Pessoa, A. (2015). Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Critical Reviews in Biotechnology*, 8551(December), 1–18. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1120705>
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Adrendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., ... Richardson, D. C. (2003). Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 50(August 2002), 437–450. <https://doi.org/10.1002/prot.10286>
- Magnan, C. N., Zeller, M., Kayala, M. A., Vigil, A., Randall, A., Felgner, P. L., y Baldi, P. (2010). High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data. *Bioinformatics*, 26(23), 2936–2943. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq551>
- Mangamuri, U., Vijayalakshmi, M., Ganduri, V. S. R. K., Rajulapati, S. B., y Poda, S. (2017). Extracellular L-Asparaginase from Streptomyces labedae VSM-6: Isolation, Production and Optimization of Culture Conditions Using RSM. *Pharmacognosy Journal*, 9(6), 932–941. <https://doi.org/10.5530/pj.2017.6.146>
- Meena, B., Anburajan, L., Sathish, T., Vijaya Raghavan, R., Dharani, G., Valsalan Vinithkumar, N., y Kirubakaran, R. (2015). I-Asparaginase from Streptomyces griseus NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of I-asparaginase gene. *Scientific Reports*, 5(1), 12404. <https://doi.org/10.1038/srep12404>
- Moreno-Enríquez, A., Evangelista-Martínez, Z., González-Mondragón, E. G., Calderón-Flores, A., Arreguín, R., Pérez-Rueda, E., y Huerta-Saquero, A. (2012). Biochemical characterization of recombinant L-asparaginase (AnsA) from Rhizobium etli, a member of an increasing Rhizobial-type family of L-asparaginases. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(3), 292–300. <https://doi.org/10.4014/jmb.1107.07047>
- Narayana, K. J. P., Kumar, K. G., y Vijayalakshmi, M. (2008). L-asparaginase production by Streptomyces albidoflavus. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), 331–336. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0018-1>
- Narta, U. K., Kanwar, S. S., y Azmi, W. (2007). Pharmacological and clinical evaluation of I-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 61(3), 208–221. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.07.009>
- Ortuño-Olea, L., y Durán-Vargas, S. (2000). The L-asparagine operon of Rhizobium etli contains a gene encoding an atypical asparaginase. *FEMS Microbiology Letters*, 189(2), 177–182. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00275-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00275-5)

- Paul, S., Lindestam, C. S., Scriba, T. J., Dillon, M. B. C., Oseroff, C., Hinz, D., ... Sette, A. (2015). Development and validation of a broad scheme for prediction of HLA class II restricted T cell epitopes. *Journal of Immunological Methods*, 422, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.03.022>
- Pieters, R., Hunger, S. P., Boos, J., Rizzari, C., Silverman, L., Baruchel, A., ... Pui, C. H. (2011). L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 117(2), 238–249. <https://doi.org/10.1002/cncr.25489>
- Ramya, L. N., Doble, M., Rekha, V. P. B., y Pulicherla, K. K. (2012). L-asparaginase as potent anti-leukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(8), 2144–2159. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9755-z>
- Rizzari, C., Conter, V., Starý, J., Colombini, A., Moericke, A., y Schrappe, M. (2013). Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Current Opinion in Oncology*, 25 Suppl 1(Suppl 1), S1-9. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835d7d85>
- Salzer, W., Bostrom, B., Messinger, Y., Perissinotti, A. J., y Marini, B. (2017). Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1386305>
- Sanches, M., Kraunchenko, S., y Polikarpov, I. (2016). Structure , Substrate Complexation and Reaction Mechanism of Bacterial Asparaginases. *Current Chemical Biology*, 1(August), 75–86. <https://doi.org/10.2174/187231307779814057>
- Singh, S. K., Cousens, L. P., Alvarez, D., y Mahajan, P. B. (2012). Determinants of immunogenic response to protein therapeutics. *Biologicals*, 40(5), 364–368. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.06.001>
- Sturniolo, T., Bono, E., Ding, J., Raddrizzani, L., Tuereci, O., Sahin, U., ... Hammer, J. (1999). Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nature Biotechnology*, 17(6), 555–561.
- Ueno, T., Ohtawa, K., Mitsui, K., Kodera, Y., Hiroto, M., Matsushima, A., ... Nishimura, H. (1997). Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia*, 11(11), 1858–61. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2400834>
- Wang, P., Sidney, J., Kim, Y., Sette, A., Lund, O., Nielsen, M., y Peters, B. (2010). Peptide binding predictions for HLA DR , DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 568. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-568>
- Xu, D., y Zhang, Y. (2011). Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophysical Journal*, 101(10), 2525–2534. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.10.024>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>

## Anexos

---

### A1. Secuencia de aminoácidos de las L-asparagininas de referencia

>P00805 L-Asparaginasa 2 *Escherichia coli*

MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTVGKVGVENLVNAVPO  
LKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDNVWLTAKKINTDCDKTDGFVITHGTDMEETAYFLDLTV  
KCDKPVVMVGAMRPSTMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGVLLVMNDTVLDGRDVTK  
TNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYANASDL  
PAKALVDAGYDGVISAGVGNGLYKSVFDLATAAKTGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKY  
GFVASGTLNPQKARVLLQLALTQTKDPQQIQQIFNQY

**Nota:** El péptido señal se indica en la secuencia sombreada.

>Q9K4F5 L-Asparaginasa 2 *Streptomyces coelicolor*

MQPSHPSQPSHADRAAPTSALAPVPPVLAEVVRS GFVEGRHRGSLVVLGADGAVELALG  
EVTAPVFPRSSNKPMQAAGVLRAGLDLAGERLALAAASHSGEPFHRDLVRKMLDEYGLDP  
ALLQCPPDLPLDAEERETYLASGAEPDRVTMNC SGKHTAMLAVCAQQGWPLETYLDPEHP  
LQRVIHRVVEDAAGEPVAAVGTDGCGAPLMAISLVGLARAFRSFVAAEPGSAERRVADAM  
RAHPEYVAGSRRADTWLMREVPGLSKMGAEAVQAVALPDGRALAFKIEDGATRALGPVL  
ARALLGVDPVVGRIGRAPLLGGGREVGEIRASF

## A2. Secuencia de aminoácidos de las L-asparaginidas *Streptomyces scabrisporus*

### >WP\_078979039.1 – SsAII-1

MHVALFTLGGTIAMAGSDGSATGPVVRNLTGADLTAAPVGLTESGVRLR  
VQDVRAVPSADLTFARILDVVAAGSRAVAEGAAGVVVTQGTDTLEETAYL  
VDLVWPHPEPFVLTGAMRNPTLAGPDGPANLLAAVRVAAAEPARGLGAL  
VVLGDEIHAARRVRKTHSSSTSASFASPDGPLGRVVEERVILTAPPRHTPLP  
TPSTAALAEARVALYPATFDDDGALLAGLPGGHRGLVVAGFGVGHVSSAL  
APTLGALAERIPVVLTSRTGAGPVLRHTYGAIGSETDLQRRGLLGGGLDPY  
KARVLLRLLLASGADRATITAAFAEHG

### >WP\_078980718.1 – SsAII-2

MRPEDTVPHESTTRYAELAEVVRSGFVESRHFVSLVALAPDGRPALELGP  
NEPVVPRSSAKPFQALACL RAGAPLSGAHVIAAAGSHTGQDFHVDAVEDI  
LTRSGLTFDALGCPPSRPEDEDTYQEMIARGEENTRERMNCSGKHAAML  
ACVASGWPTEGYLDPGHPLQVLVREGIEELAGESVAHTAVDGC GAPVFAM  
TLTGLARGVRLATATTGPERVVAKAMREHPAYVGGDQANTEVMRLPG  
VLVKGGAEGVFVAATTAGHAVAVKVIDGSPRATTALALAALHRLGVDVSAA  
SEWTTVPVLGGGLPVGEVRVTSHLG