

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA
GLUCOCEREBROSIDASE HUMANA
EM CÉLULAS CHO**

ESTHER VINHAIS GUTIERREZ

2010



CLONAGEM E EXPRESSÃO DA GLUCOCEREBROSIDASE HUMANA EM CÉLULAS CHO

ESTHER VINHAIS GUTIERREZ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2010

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA GLUCOCEREBROSIDASE
HUMANA EM CÉLULAS CHO

Esther Vinhais Gutierrez

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada por:

Presidente, Prof. Leda dos Reis Castilho

Prof. Rodrigo Volcan Almeida

Prof. Helen Conceição Ferraz

Prof. Ângela Maria Moraes

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2010

Gutierrez, Esther V.

Clonagem e expressão da glucocerebrosidase humana em células CHO/Esther Vinhais Gutierrez – Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2010.

xi, 109f.

Orientador: Leda dos Reis Castilho

Dissertação (mestrado) – UFRJ/IQ/Programa de Pós-graduação em Bioquímica, 2010.

Referências Bibliográficas: f. 97-106.

1. Glucocerebrosidase. 2. Células CHO. 3. Sistema de integração sítio dirigida. 4. N-glicosilação. I. Castilho, Leda dos Reis. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Bioquímica. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Leda Castilho por me aceitar para a realização do mestrado em seu laboratório, pelo incentivo profissional e confiança.

Aos meus pais, minha irmã e minha tia, por me incentivarem constantemente e pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis.

Aos meus avôs pelo belo exemplo de vida e luta, e pelo carinho e torcida de vocês.

Aos meus companheiros do Laboratório de Engenharia de Cultivo Celulares (LECC/BIOMOL) pelo incentivo, conselhos, ajudinhas e alegrias, que fizeram com que este trabalho pudesse ser realizado de maneira mais simples e divertida.

À Maíra Pellegrini que com sua “santa paciência” me ensinou as principais técnicas de biologia molecular e cultivo de células, estando sempre disposta a me auxiliar e discutir experimentos e resultados, me ajudando a solucionar diversos dos problemas enfrentados no decorrer do trabalho. Muito obrigada!!!

Ao querido José Cremata (CIGB - Cuba) pelos sábios ensinamentos transmitidos sobre a glicosilação.

Ao Marcos Pinho e a Joyce Luana pela ajuda com as análises de PCR em tempo real.

A todos os meus amigos pela amizade e compreensão nos meus diversos momentos de ausência.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA GLUCOCEREBROSIDASE HUMANA EM CÉLULAS CHO

Esther Vinhais Gutierrez

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Neste trabalho foram realizadas a clonagem e a expressão do gene da enzima glucocerebrosidase, utilizada na terapia de reposição enzimática para o tratamento da Doença de Gaucher. Diferentes linhagens derivadas de células CHO (células de ovário de hamster chinês), algumas delas mutantes em enzimas do processo de *N*-glicosilação, foram utilizadas para a produção da proteína recombinante, fazendo com que esta apresentasse diferentes oligossacarídeos em sua estrutura. Além de diferentes linhagens hospedeiras, foram avaliados diferentes vetores de expressão que resultam em diferentes modos de integração do transgene no genoma celular. Utilizando-se o vetor de integração aleatória pcDNA3.1 e o vetor de integração sítio-dirigida pcDNA5/FRT, obtiveram-se menores níveis de expressão quando este último sistema foi utilizado. Foram realizadas análises de imunodeteção e ensaios de atividade enzimática para avaliar a presença da enzima recombinante no sobrenadante de clones obtidos das diferentes linhagens. No entanto, para a maioria dos clones, não se verificou uma relação direta entre os resultados das diferentes análises. Diversos clones foram selecionados por secretarem uma quantidade satisfatória de glucocerebrosidase na sua forma ativa.

Palavras-chave: glucocerebrosidase, células CHO, sistema de integração sítio-dirigida, *N*-glicosilação.

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2010

ABSTRACT

CLONING AND EXPRESSION OF HUMAN GLUCOCEREBROSIDASE

IN CHO CELL

Esther Vinhais Gutierrez

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

In this work the cloning and expression of the enzyme glucocerebrosidase gene were performed. This enzyme is used in enzyme replacement therapy for the treatment of Gaucher's disease. Different cell lines derived from CHO (Chinese hamster ovary) cells, some of them mutants in *N*-glycosylation pathway enzymes, were used for the production of this recombinant protein, resulting in different oligosaccharides' structures. Besides the use of different host cell lines, two expression vectors resulting in different integration of the transgene into the cell genome, were analyzed. The evaluation of CHO cells transfected with the random integration vector pcDNA3.1 and the site-direct integration vector pcDNA5/FRT was carried out, surprisingly resulting in low levels of expression when the latter system was used. Analysis were performed using both the immunodetection and enzymatic activity methods to evaluate the presence of recombinant enzyme at the supernatant of the clones obtained from the different cell line. However, for most of the clones, it was not found a direct relationship between the results of the different analysis. Several clones were selected for having secreted a satisfactory amount of glucocerebrosidase in its active form.

Key-words: glucocerebrosidase, CHO cells, site-directed integration system, *N*-glycosylation.

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2010

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Biofármacos	1
1.2- Glucocerebrosidase (GBA)	2
1.3- Doença de Gaucher	5
1.4- Tratamento	7
1.5- Sistemas de expressão procarióticos	10
1.6- Sistemas de expressão eucarióticos	12
1.6.1- Leveduras	12
1.6.2- Fungos filamentosos	13
1.6.3- Células de insetos	13
1.6.4- Plantas	14
1.6.5- Animais transgênicos	14
1.6.6- Células de mamíferos	15
1.6.6.1- Integração sítio dirigida	16
1.6.6.2- Sequência de Kozak	18
1.7- Principal patente relacionada à produção de GBA	18
1.8- Glicosilação	20
1.8.1- Micro e macro-heterogeneidade	22
1.8.3- Glicosilação em diversos sistemas de expressão	24
1.9- Justificativa	28
2- OBJETIVOS	29
2.1- Objetivo geral	29
2.2- Objetivos específicos	29
3- METODOLOGIA	30
3.1- Linhagens celulares	30
3.2- Manutenção das linhagens celulares	32
3.2.1- Células de mamíferos	32
3.2.2- Células bacterianas	32
3.3- Criopreservação das Linhagens Celulares	32
3.3.1- Células de mamíferos	32
3.3.2- Células bacterianas	33
3.4- Descongelamento das Linhagens Celulares	33
3.4.1- Células de mamíferos	33
3.4.2- Células bacterianas	33
3.5- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	33
3.6- Clonagem do gene de interesse	35
3.7- Transformação Bacteriana	40
3.7.1- Preparo de Bactérias Competentes	40
3.7.2- Transformação Bacteriana pelo Método de Choque Térmico	40
3.8- Extração Plasmidial	41
3.9- Transfecção das Células de Mamíferos	41
3.9.1- Transfecção estável	41
3.9.2- Transfecção transiente	42
3.10- Seleção de clones	42
3.11- Métodos Analíticos	43
3.11.1- Determinação da concentração de células viáveis.....	43

3.11.2- Detecção em membrana da glucocerebrosidase	43
3.11.3- Lise celular para análise da GBA intracelular	44
3.11.4- Precipitação de proteínas	44
3.11.5- SDS-PAGE e <i>Western-blot</i>	45
3.11.6- Teste de atividade enzimática	46
3.11.7- PCR em tempo real	47
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1- Clonagem do gene da GBA nos vetores de expressão	52
4.2- Transfecção das diferentes linhagens CHO com os vetores de expressão.....	57
4.3- Isolamento de clones por diluição limite	57
4.4- Análise dos clones por imuno- <i>blot</i>	59
4.5- Análise da secreção e da atividade da β -glucocerebrosidase	66
4.6- Análise da expressão de GBA por PCR em tempo real	72
4.7- Discussão do perfil de glicosilação	80
4.8- Construção dos vetores de expressão com a sequência de Kozak	84
4.9- Influência da sequência de Kozak na expressão e produção da GBA.....	90
4.10- Análise da baixa produção de GBA por clones obtidos a partir do sistema de integração sítio-dirigida.....	93
5- CONCLUSÕES E SUGESTÕES	95
5.1- CONCLUSÕES	95
5.2- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO I	107
Anexo I.1	107
Anexo I.2	108
Anexo I.3	109

LISTA DE ABREVIACÕES

Ala	alanina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Asn	asparagina
$\beta 4GalT-6$	gene que codifica a β -4-galactosil-transferase-6
BHK	linhagem celular de rim de hamster neonato
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CHO	linhagem celular de ovário de hamster chinês
CMV	citomegalovírus
CO ₂	dióxido de carbono
Cre	recombinase do bacteriófago P1
Cys	cisteína
DHFR	dihidrofolato redutase
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DPP	estrutura de oligossacarídeo pré-formada
DNA	ácido desoxirribonucléico
EFa1	fator de alongação
EGFP	proteína verde fluorescente acentuada
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPO	eritropoetina
ERAD	processo de degradação protéica associada ao retículo endoplasmático
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FNC	fosfolípidos negativamente carregados
FLP	recombinase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FRT	sítio de reconhecimento da recombinase FLP
GalNAc	α -N-acetil-galactosamina
GalNAcT	α -N-acetil-galactosamina-transferase
GalT I	β (1,4)-galactosil-transferase-I
GBA	β -glucocerebrosidase
GlcNAc	N-acetil-glicosamina
GlcNAc-TI	β -1,2-N-acetil-glicosaminil-transferase I
GnT I	N-acetil glicosamina transferase-I
GnT II	N-acetil glicosamina transferase-II
HeLa	linhagem celular derivada de carcinoma humano
His	histidina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IRES	sítio de entrada interna de ribossomo
<i>lacZ</i>	gene da β -galactosidase
LB	Luria-Bertani
<i>loxP</i>	sítio de reconhecimento da recombinase Cre
<i>Mgat1</i>	gene que codifica a GlcNAc-TI
MTX	metotrexato
4-MU	4-metilumbeliferona
4-MUD	4-metilumbeliferol- β -D-glucopiranosídeo
NeuAc	N-acetil-neuramínico
Neu5Gc	N-glicolil-neuramínico

NIH	<i>National Institutes of Health</i>
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PHA-L	leucoaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
OST	enzima oligossacaril transferase
rBV	baculovírus como vetor recombinante
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _t	RNA transportador
Ser	serina
Sf9	linhagem de células de <i>Spodoptera frugiperda</i>
SFB	soro fetal bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS	solução salina de tris-tamponada
Thr	treonina
TM	temperatura de anelamento
tPA	ativador de plasminogênio tecidual

I- INTRODUÇÃO

1.1 BIOFÁRMACOS

As primeiras proteínas utilizadas para fins terapêuticos possuíam origem humana. Os fatores de coagulação sanguínea e a albumina eram extraídos do plasma, a insulina do pâncreas e a glucocerebrosidase da placenta.

Uma grande motivação para a produção de proteínas em sistemas recombinantes tem sido a de fornecer alternativas mais seguras aos produtos de origem humana. Estes possuem o risco potencial de transmissão de patógenos e este risco aumenta quando o material é gerado através de um *pool* de diversos doadores. Na França, durante a década de 1980, milhares de pacientes hemofílicos foram infectados com HIV por terem sido tratados com produtos derivados de sangue contaminado (Anderson, 1991). No Brasil, estima-se que esse número tenha sido superior a 6 mil hemofílicos. No Japão, entre 1964 e 1988, mais de 10 mil pessoas foram infectadas com hepatite C pela utilização do fibrinogênio derivado do sangue (Yasunaga, 2007).

Contaminações em larga escala foram documentadas em diversos países. As preocupações com potenciais riscos de contaminação com vírus e príons, assim como o desenvolvimento de técnicas de engenharia genética, fizeram com que a produção dessas proteínas fosse, em grande parte, transferida para sistemas de expressão recombinantes.

O termo “biofármaco” possui várias conotações, porém a definição mais aceita é de que "Biofármacos são proteínas ou ácidos nucleicos utilizados com fins terapêuticos ou de diagnóstico *in vivo*, produzidos de uma forma que não a extração a partir de uma fonte natural" (Walsh, 2002).

O primeiro biofármaco aprovado para uso em humanos, pelo FDA em 1982, foi a insulina recombinante humana (Humulina®), produzida pela empresa Genentech, desenvolvida a partir da aplicação de técnicas do DNA recombinante em linhagem de *Escherichia coli*.

Quatro anos depois, foi aprovado o tPA (ativador de plasminogênio tecidual), primeiro biofármaco produzido em células de mamíferos recombinantes, expresso na linhagem CHO.K1 (células de ovário de hamster chinês). Menos de três décadas após a aprovação do primeiro produto, a fabricação de biofármacos recombinantes pode ser considerada um sucesso. De acordo Lawrence 2007, aproximadamente um sexto dos medicamentos líderes de vendas são produtos biotecnológicos. Nove entre dez biofármacos são produzidos em cultura de células animais e, pelo menos, 23 proteínas recombinantes terapêuticas já obtiveram vendas totais superiores a US\$ 1 bilhão (Kind & Schnieke, 2008).

A maioria dos primeiros produtos fabricados nessa área consistiu de cópias fidedignas das proteínas nativas para tratamento de reposição, como a eritropoetina e os fatores da coagulação sanguínea. Posteriormente, foram desenvolvidos biofármacos com estrutura modificada por técnicas

de engenharia de proteínas para apresentar melhoras na biodisponibilidade, tempo de meia vida do produto e estabilidade. Atualmente, os anticorpos monoclonais, quiméricos (compostos pela combinação da região variável murina com a região constante da imunoglobulina humana) e humanizados (nos quais apenas o sítio de ligação ao antígeno tem origem murina), principalmente utilizados no tratamento do câncer, estão ganhando destaque.

A produção e a purificação de produtos recombinantes devem estar de acordo com as normas estabelecidas pelos órgãos regulatórios como o FDA, nos Estados Unidos, o EMEA, na União Européia, e a ANVISA, no Brasil, e com as Boas Práticas de Fabricação (conjunto de medidas que devem ser adotadas pelas indústrias a fim de garantir a qualidade sanitária e a conformidade dos produtos com os regulamentos técnicos). As boas práticas envolvem o treinamento de pessoal, validação de processos, equipamentos, materiais e instalações, assim como os procedimentos operacionais padrão. Os critérios, como a matéria-prima a ser utilizada, tamanho do lote e qualidade e pureza do produto devem ser previamente definidos para garantir sua padronização. Além disso, durante todo o processo, é essencial a documentação e registro de todas as atividades realizadas, desde a construção do DNA recombinante até o produto acabado.

O conceito de produto biológico bem caracterizado tem sido fundamental para o registro de um produto recombinante. Ele foi primeiramente definido em 1995 pelo FDA como "uma entidade química cuja identidade, pureza, potência e quantidade podem ser determinadas e controladas" (Schultz, 1995). Obedecer todas essas exigências é mais difícil para os produtos biológicos quando comparados aos produtos químicos. Como os produtos biofarmacêuticos encontravam muitos problemas para se enquadrar nessa definição, foram requisitadas alterações. Embora padrões apropriados para pureza, potência e quantidade possam ser facilmente estabelecidos, o conceito de "identidade" não é simples. A estrutura molecular de uma proteína pode ser caracterizada, mas tanto a proteína recombinante quanto a nativa são formadas por uma mistura de isoformas sutilmente diferentes. Além disso, uma proteína produzida em um sistema heterólogo raramente será a réplica idêntica da sua forma nativa, mas, no entanto, pode funcionar tão bem quanto. Entretanto, a segurança e eficácia, conforme determinadas pelos ensaios pré-clínicos e clínicos, são obviamente os critérios mais importantes na análise de um produto que deseja ingressar no mercado farmacêutico (Kind & Schnieke, 2008).

1.2 GLUCOCEREBROSIDASE

A β -glucocerebrosidase (GCase, GBA, glucocerebrosidase, *N*-acetil-esfingosil- β -D-glicose glicohidrolase, β -glucosidase ácida, EC 3.21.45) pertence ao grupo das β -glicosidases e é codificada pelo gene de 7.5 kb, com 11 éxons, localizado no cromossoma 1q21. Mutações nessa enzima causam uma desordem conhecida como Doença de Gaucher. Muitas destas mutações parecem

surgir de conversões gênicas entre o gene da GBA humana e seu pseudo-gene, porém esta hipótese ainda não foi comprovada. A estrutura do *locus* gênico da GBA no cromossoma 1 está representada na Figura 1.

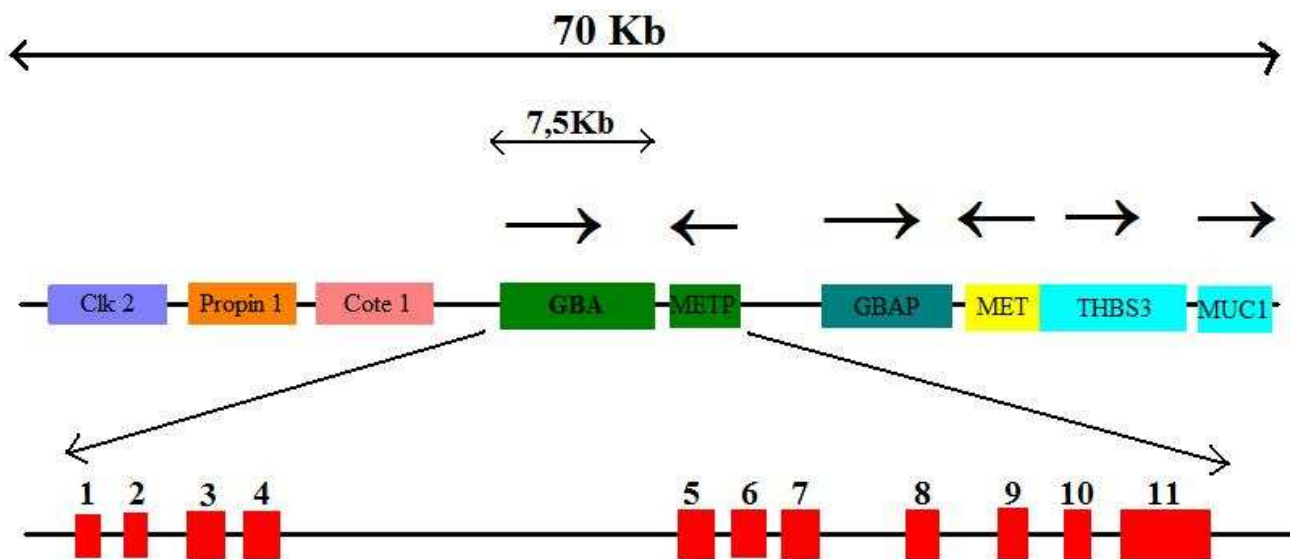


Figura 1: Esquema do *locus* da GBA e os genes ao seu redor no cromossoma 1. Clk2, semelhante à serina/treonina quinase; propin 1, um gene de função não conhecida; cote 1, um gene de função não conhecida; METP, um pseudo-gene da metaxina; MET, metaxina, uma proteína da membrana mitocondrial; GBAP, pseudo-gene da GBA. THBS3, trombospondina; MUC1, gene da mucina epitelial polimórfica. As setas indicam a direção de transcrição dos vários genes. Em vermelho podem ser observados os 11 éxons que compõem a sequência codificante (Figura adaptada de Zhao & Grabowski, 2002).

O pseudo-gene da glucocerebrosidase é altamente homólogo ao gene normal, com 96% de identidade, com tamanho de aproximadamente 5 kb e está localizado 16 kb depois do gene funcional. Esse pseudo-gene é transcrito, mas não resulta em nenhuma proteína funcional, devido a diversas mutações que geraram códons de terminação. As principais diferenças entre o gene funcional e o pseudo-gene são a presença de diversas pequenas deleções nos íntrons 2, 4, 6 e 7, numerosas mutações do tipo sem sentido nos éxons e uma deleção de 55pb no éxon 9 do pseudo-gene (Grabowski & Horowitz, 1997).

Esse pseudo-gene não está presente nas demais espécies de mamíferos. As vinte junções entre éxons e íntrons no gene funcional são bastante conservadas em animais e camundongos. Quando comparados ao gene humano, os genes caninos e murinos possuem 88 e 84% de identidade dos nucleotídeos exônicos, respectivamente. Em relação ao humano, os cDNAs preditos apresentam identidade de aminoácidos de 92% (canino) e 87% (murino). A deleção de apenas um aminoácido, His 274, foi predita na sequência do camundongo. Os resíduos de cisteína são 100% conservados. As posições dos 5 sítios de *N*-glicosilação são rigorosamente conservadas e as sequências são idênticas na β -glucocerebrosidase em caninos e humanos (Grabowski & Horowitz, 1997).

A GBA é uma β -glucosidase associada à membrana lisossomal composta por 497 aminoácidos, com massa molar de 55.565 Da. Essa enzima é um glicoproteína que contém cinco sítios de *N*-glicosilação, dos quais os primeiros quatro estão normalmente ocupados (Berg-Fussmann *et al.*, 1993). A ocupação do primeiro sítio de *N*-glicosilação formado por Asn19, Ala20 e Thr21 é essencial para o desenvolvimento da conformação ativa catalítica, provavelmente orientando a formação de ligações dissulfeto. A GBA possui sete resíduos de cisteína: Cys4, Cys16, Cys18, Cys23, Cys126, Cys248 e Cys342. Os primeiros quatro participam da formação de ligações dissulfeto Cys4-16 e Cys18-23, enquanto os outros três resíduos de cisteína Cys126, Cys248 e Cys342 permanecem livres (Moharram *et al.*, 2006).

Existem dois códons ATG funcionais no gene da β -glucocerebrosidase. Quando a tradução começa no primeiro ATG, resulta em um cDNA de 1.611pb, com um peptídeo líder de 38 aminoácidos. Ele contém uma sequência altamente hidrofílica de 19 resíduos de aminoácidos, seguida por uma sequência hidrofóbica de mais 19 aminoácidos. Quando a síntese da proteína começa no segundo ATG, gerando um cDNA com 1.551pb, o peptídeo líder é formado somente pelos 19 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Pasmanik-Chor *et al.*, 1996). O contexto ao redor do segundo ATG é bastante similar à sequência consenso descrita por Kozak (Kozak, 1986 e 2002). O contexto dos códons de iniciação ATG pode ser facilmente visualizado na Figura 2.

ATG GAG TTT TCA AGT CCT TCC AGA GAG GAA TGT CCC AAG CCT TTG
 AGT AGG GTA AGC ATC **ATG** GCT GGC AGC CTC ACA GGA TTG CTT CTA
 CTT CAG GCA GTG TCG TGG GCA TCA GGT

ATCATGG

Figura 2: Representação esquemática dos códons ATG funcionais na β -glucocerebrosidase. O peptídeo líder pode conter os 38 resíduos de aminoácidos gerados quando a proteína é traduzida a partir do primeiro ATG, sendo os primeiros 19 hidrofílicos, representados em azul, e os 19 últimos hidrofóbicos, representados em vermelho. Quando a GBA é traduzida a partir do segundo ATG, somente os últimos 19 resíduos de aminoácidos (cor vermelha) formam o peptídeo líder. Em destaque, pode-se observar a sequência similar àquela descrita por Kozak, com purinas nas posições -3 e +4.

A GBA é sintetizada, o seu peptídeo líder é clivado após sua passagem pela membrana do retículo endoplasmático, sendo glicosilada co-traducionalmente, e sofrendo subseqüentes modificações na sua sequência de oligossacarídeos, durante sua passagem através do complexo de Golgi. Essa enzima é direcionada para o lisossoma por uma via independente do receptor de manose-6-fosfato (Reczek *et al.*, 2007).

Normalmente, pouca β -glucocerebrosidase é secretada pelas células, porém quando superexpressa, quantidades significativas são secretadas, devido, provavelmente, à saturação do

sistema de transporte da enzima ao compartimento lisossomal (Leonova & Grabowski, 2000). A ligação da GBA à membrana do lisossoma parece ser importante, pois em sistemas que a superexpressam, a meia vida da enzima livre no lisossoma (não secretada) é muito menor do que quando ligada à membrana (Leonova & Grabowski, 2000).

Enzimas purificadas da placenta e presentes nos fibroblastos têm massas molares de 60.000-68.000 Da, devido à presença de distintas glicofomas (Bergmann & Grabowski, 1989; Jonsson *et al.*, 1987). A glucocerebrosidase é ativa na forma monomérica. A enzima purificada requer fosfolípídeos negativamente carregados (FNC) ou detergentes (como os sais biliares) para ter atividade e, na ausência de tais agentes, é essencialmente inativa *in vitro* (Grabowski *et al.*, 1998).

1.3 DOENÇA DE GAUCHER

Em 1882, o médico francês Dr. Philippe Charles Ernest Gaucher observou um paciente de 32 anos de idade com esplenomegalia atribuída a um tumor no baço, com infiltração do seu parênquima por células com grandes núcleos. Anos mais tarde, a doença de Gaucher, que recebeu esse nome em homenagem ao médico que primeiramente a descreveu, teve sua natureza metabólica descoberta (Grabowski *et al.*, 1998).

A doença de Gaucher (MIM 230800, 230900 e 231000), a mais comum das doenças de armazenamento lisossomal, é uma desordem recessiva autossômica, a qual resulta na deficiência da glucocerebrosidase. Quando os alelos mutantes são expressos, produzem proteínas com anomalias complexas que incluem defeitos nas propriedades catalíticas e na estabilidade das proteínas dentro das células (Grace *et al.*, 1991 e 1994).

A glucocerebrosidase tem como função catalisar a degradação de glucocerebrosídeos. Estes podem ter origem através de duas rotas principais: a degradação dos glicoesfingolípídeos sintetizados endogenamente, incluindo os gangliosídeos presentes em vários tecidos, assim como a fagocitose da membrana plasmática e das membranas celulares internas pelo sistema dos macrófagos para degradação e reciclagem. Nas fontes externas ao sistema nervoso central, o acúmulo principal de glucocerebrosídeos nos pacientes parece ser derivado da renovação das membranas dos elementos sanguíneos e através do sistema de monócitos e macrófagos (Kattlove *et al.*, 1969).

Em pessoas afetadas pela doença de Gaucher, os glucocerebrosídeos se acumulam dentro dos macrófagos, levando a um aumento de tamanho dos mesmos, formando as chamadas células de Gaucher, que se localizam, principalmente, no baço e no fígado, causando o funcionamento anormal desses órgãos.

A frequência mundial dessa doença é de um a cada sessenta mil indivíduos, com uma incidência particularmente elevada na população de judeus Ashkenazi (devido a casamentos

consangüíneos), na qual a proporção de indivíduos afetados é de um a cada mil. Atualmente, existem mais de duzentas mutações pontuais identificadas no gene que codifica a β -glucocerebrosidase (Butters, 2007).

Clinicamente, a doença de Gaucher é caracterizada por uma vasta heterogeneidade de fenótipos, que nem sempre podem ser preditos a partir da análise do genótipo do paciente, com manifestações variando desde morte intra-uterina a idosos assintomáticos. A doença é classicamente dividida em três tipos, baseados na ausência ou presença e na taxa de progressão das manifestações neurológicas (Hoppe, 2000).

O tipo I, ou doença de Gaucher não-neuropática, apresenta incidência muito superior aos demais. Mesmo entre os pacientes do tipo I, há uma variabilidade tanto na apresentação quanto na progressão da doença. A mutação N307S é o genótipo mais comumente presente na população de judeus Ashkenazi e é classicamente relacionada à forma mais branda da doença e, portanto, muitas vezes, os indivíduos não são diagnosticados.

No entanto, em alguns pacientes do tipo I as manifestações da doença são significativas, podendo haver evidência clínica ou radiográfica de lesão óssea (osteopenia, lesões focais, osteonecrose lítica ou esclerótica), hepatoesplenomegalia, anemia e trombocitopenia, doença pulmonar, mas com a ausência de sintomas no sistema nervoso central.

Os tipos II e III são caracterizados pela presença de sintomas neurológicos preliminares. No passado, eles eram distinguidos somente pela idade na qual os sintomas tinham início e pela taxa de progressão da doença, mas estas distinções não são absolutas. Os indivíduos com sintomas iniciados antes dos dois anos de idade, com desenvolvimento psicomotor limitado e um avanço rápido e progressivo da doença, levando à morte entre dois e quatro anos de idade, foram classificados como tipo II. Os indivíduos com tipo III da doença de Gaucher, para o qual alguns genótipos como L444P, G202R e D409H foram identificados, têm o início dos seus sintomas antes da idade de dois anos, porém freqüentemente seguidos de um avanço mais lento, podendo viver até a terceira ou quarta década de vida (Butters, 2007).

Mais recentemente, a avaliação clínica de diversos pacientes com a doença de Gaucher tem levado à conclusão de que essa doença é mais bem caracterizada como uma série de fenótipos, alguns dos quais não se enquadram na classificação dos três tipos clássicos. Contudo, existem alguns casos nos quais não se sabe se as manifestações neurológicas observadas são uma consequência primária da deficiência enzimática ou se são um efeito secundário (Sidransky, 2004). A diversidade de fenótipos está esquematizada na Figura 3.

O diagnóstico clínico para a doença de Gaucher é feito através da observação de lesões características nos ossos, presença de hepatoesplenomegalia e mudanças hematológicas, ou sinais de envolvimento do sistema nervoso central. O resultado clínico sozinho não é diagnóstico, sendo

requerido um ensaio da atividade enzimática da β -glucocerebrosidase em leucócitos sanguíneos periféricos ou em outras células nucleadas, através de um teste fluorimétrico. Em indivíduos afetados, a atividade da enzima glucocerebrosidase nos leucócitos é 0-15% da atividade normal. Contudo, os resultados do teste bioquímico não permitem a predição da severidade ou do tipo da doença.

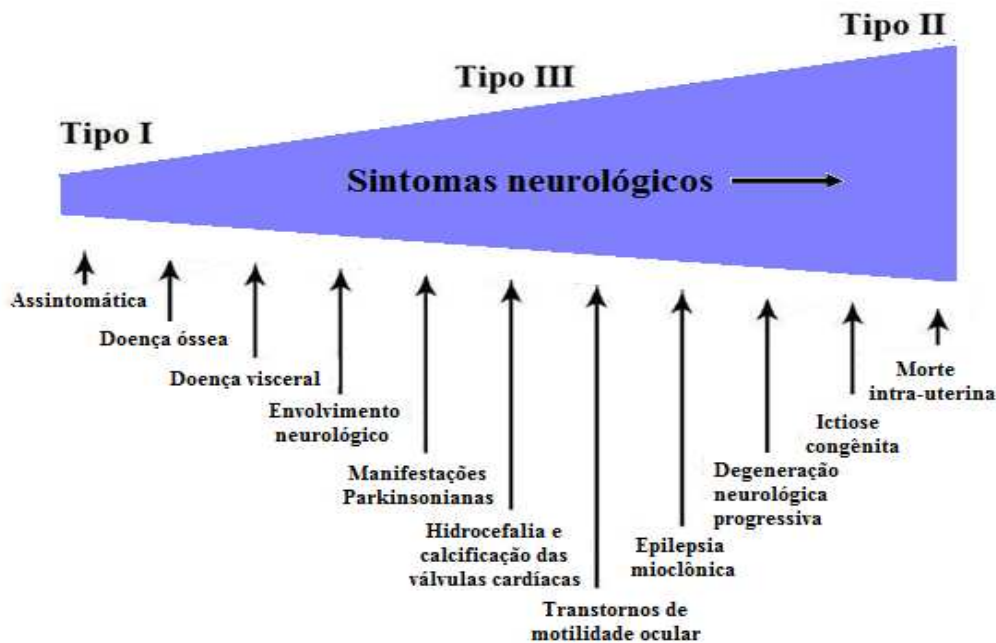


Figura 3: Sintomas da doença de Gaucher. Esta desordem apresenta um amplo espectro de fenótipos, tendo como distinção primária a presença ou ausência de manifestações neurológicas (Figura adaptada de Sidransky, 2004).

1.4 TRATAMENTO

A terapia de reposição enzimática para tratamento da doença de Gaucher foi realizada pela primeira vez em 1974 no National Institutes of Health (NIH), onde foram administradas infusões intravenosas contendo pequenas quantidades de glucocerebrosidase derivada de placenta. Os resultados iniciais não foram nada animadores, pois a enzima parecia não ser absorvida pelos macrófagos.

Então, em 1991, o primeiro medicamento para o tratamento da doença de Gaucher foi testado em um estudo clínico publicado pelo New England Journal of Medicine. O medicamento Ceredase® (alglucerase), produzido pela empresa Genzyme, que era obtido através da purificação da glucocerebrosidase humana derivada da placenta e sofria algumas etapas de modificação dos seus açúcares terminais para expor resíduos de manose. Essas etapas incluíam o tratamento com as enzimas sialidase, β -galactosidase e β -N-acetil-glicosaminidase. Desta maneira, o conteúdo de oligossacarídeos totais da molécula passou de 12% da glucocerebrosidase ($M_r=67.000$), para 6% no Ceredase ($M_r=60.430$). O estudo foi realizado em apenas 12 pacientes, com dosagem de 60 U/Kg a

cada duas semanas, e obteve excelentes resultados já nos primeiros 6 meses de teste, sendo aprovado pela agência sanitária norte-americana (FDA).

Em 1994, foi lançado no mercado, também pela Genzyme, o Cerezyme® (imiglucerase) que é a glucocerebrosidase recombinante cuja preparação foi baseada na seqüência do gene humano e foi modificada, conforme ilustrado na Figura 4, através das mesmas clivagens de oligossacarídeos realizadas no Ceredase, para expor os resíduos α -manosil, a fim de ser mais facilmente transportada para o interior dos macrófagos. A única diferença entre a composição de aminoácidos desses medicamentos é que o resíduo de histidina 495 foi substituído por um resíduo de arginina. Este medicamento foi aprovado pelo FDA após um estudo clínico, duplo cego, com trinta pacientes que recebiam o Cerezyme ou o Ceredase. Esse estudo teve a duração de apenas seis meses.

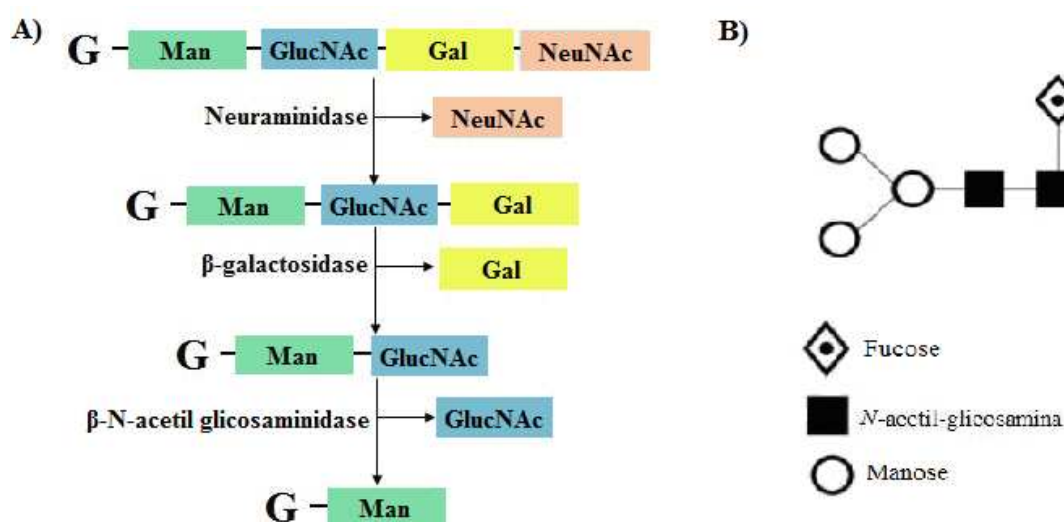


Figura 4: Representação da glucocerebrosidase recombinante presente no medicamento Cerezyme®. (A) Modificação enzimática da glucocerebrosidase recombinante (G) para produção do Cerezyme. (B) Resíduos de manose expostos com o objetivo de atingir os macrófagos numa unidade de carboidratos de Cerezyme (Figuras adaptadas de: Cerezyme® - Monografia do produto, 2001).

Esse tratamento é normalmente bem tolerado. Entretanto, aproximadamente 10-15% dos indivíduos desenvolvem anticorpos contra a enzima recombinante, embora na maioria dos casos estes indivíduos permaneçam assintomáticos (Rosenberg *et al.*, 1999). Poucos indivíduos manifestam efeitos adversos, tais como pruridos e urticárias, que são relativamente bem controlados com a utilização de anti-histamínicos.

Ainda não existe um consenso sobre a dose de enzima necessária para iniciar ou manter melhorias em pacientes significativamente afetados. A obtenção de resultados muito diversos dificulta a avaliação dos estudos sobre a curva dose/resposta. Esses fatores são: a resposta lenta dos pacientes (seis a doze meses para mudanças consistentes no perfil clínico); a falta de concordância sobre o que consistiria uma melhora; a falta de padronização das medidas utilizadas, como a

concentração da hemoglobina, contagem de plaquetas e volumes hepático e esplênico; e a falta de padronização das avaliações de mudanças na medula ou na estrutura óssea.

Embora a terapia de reposição enzimática tenha mudado a história natural da doença de Gaucher, apesar de somente ser recomendada para os tipos I e II, algumas vezes as pessoas afetadas podem exigir o tratamento sintomático, incluindo a esplenectomia parcial ou total para indivíduos com áreas significativamente enfiadas e trombocitopenia severa persistente, com risco elevado de sangramento, e transfusão de derivados sanguíneos para a anemia e sangramentos severos.

Também podem ser recomendados analgésicos para as dores nos ossos e cirurgias para reparação das articulações afetadas pela doença, assim como o tratamento suplementar com bifosfonatos e o cálcio por via oral, para indivíduos com baixa densidade óssea (Wenstrup *et al.*, 2004).

Existe ainda outra forma de tratamento, conhecida como terapia de redução do substrato, cujo objetivo é restaurar a homeostasia metabólica limitando a quantidade de substrato sintetizada a um nível que possa ser eficazmente degradado pela atividade residual da enzima mutante (Platt & Butters, 1998; Dwek *et al.*, 2002). As preocupações quanto à utilização dessa terapia giram em torno da sua não especificidade, já que o substrato bloqueado, ou limitado, é um precursor utilizado na formação de outros esfingolipídios.

O Miglustat foi aprovado em diversos países, incluindo Estados Unidos, Canadá e União Européia, como primeiro agente oral para o tratamento dos indivíduos com doença de Gaucher nas formas suave ou moderada, para os quais a terapia de reposição enzimática não é uma opção terapêutica (por causarem alergia, hipersensibilidade ou por não possuírem um bom acesso venoso). Em pelo menos três estudos envolvendo cerca de trinta indivíduos com o tipo I da doença, o tratamento com Miglustat levou a uma diminuição significativa no volume do fígado e do baço após seis e dezoito meses de tratamento, com melhorias clínicas notáveis após vinte e quatro meses. O envolvimento ósseo e plaquetário e os valores de hemoglobina permaneceram estáveis ou apresentaram melhorias modestas (Cox *et al.*, 2000; Elstein *et al.*, 2004; Pastores & Meere, 2005). As reações adversas mais notadas durante os ensaios clínicos foram a perda de peso, inchaço, flatulência e diarreia, que passaram, ou ao menos se tornaram mais brandas, ao longo da utilização do produto.

Outros compostos que estão sendo pesquisados para o tratamento da doença de Gaucher são compostos conhecidos como chaperonas farmacológicas (Grabowski, 2008). As mutações na glucocerebrosidase levam ao mau enovelamento protéico durante a tradução no RE, onde estão as vias de "controle de qualidade", normalmente envolvidas com as moléculas de oligossacarídeos da N-glicosilação. Existem mecanismos em todas as células para remoção de glicoproteínas mal enoveladas do RE via complexos de translocação (Ron & Horowitz, 2005).

Esse processo, de degradação associada ao RE (ERAD), remove, eficientemente, formas mutantes mal enoveladas da glucocerebrosidase, resultando na redução do transporte da enzima para o lisossoma. Alguns dados experimentais utilizando fibroblastos de pacientes suportam a teoria de que a severidade da doença de Gaucher está diretamente relacionada com o quanto de enzima fica retida no RE e é eventualmente degradada via ERAD (Ron & Horowitz, 2005). A terapia mediada por chaperonas é uma tentativa de "resgatar" as mutantes da glucocerebrosidase através da ligação das chaperonas às enzimas mutantes durante o enovelamento pós-traducional no RE e, conseqüentemente, de aumentar o transporte da enzima para o lisossoma, onde a mesma pode exercer sua atividade, ainda que residual (Butters, 2007).

É possível que a combinação terapêutica, baseada na terapia de redução do substrato e/ou terapia mediada por chaperonas com a reposição enzimática, permita a redução da dose e da frequência da infusão da enzima, levando a um tratamento menos custoso, porém com os mesmos benefícios. Entretanto, a segurança destes agentes para um tratamento a longo prazo ainda precisa ser avaliada com cuidado. O tratamento integrado das diferentes terapias está ilustrado na Figura 5.

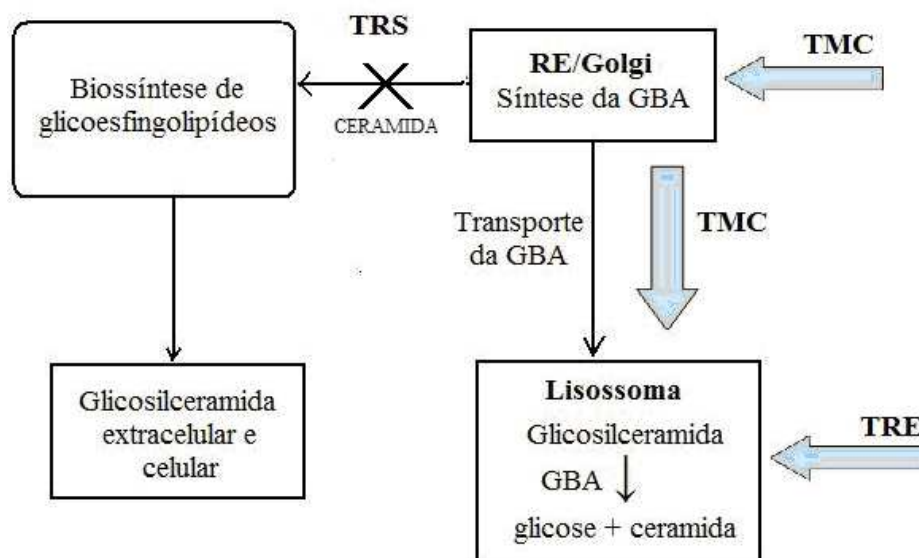


Figura 5: Vias de biossíntese e catabolismo da glicosilceramida. O RE e Golgi são os locais intracelulares de síntese da glucocerebrosidase e dos glicosfingolípídeos. Tanto a enzima quanto o substrato devem ser transportados para o lisossoma, onde ocorre o catabolismo dos glicosfingolípídeos, mediado pelas glicosidases lisossomais, incluindo a β -glucocerebrosidase. A intervenção terapêutica para o tratamento da doença de Gaucher pode incluir a terapia de redução do substrato (TRS) pela inibição parcial da biossíntese de glicosfingolípídeos; reconstituição da enzima deficiente, via terapia de reposição enzimática (TRE); correção parcial do mau enovelamento enzimático no RE, utilizando moléculas que auxiliam o transporte para o lisossoma através da terapia mediada por chaperonas (TMC) (Figura adaptada de Butters, 2007).

1.5 SISTEMAS DE EXPRESSÃO PROCARIÓTICOS

Em 1977, Itakura *et al.* conseguiram, de forma pioneira, realizar a expressão *in vitro* da somatostatina (um hormônio protéico presente nos mamíferos) em células procarióticas utilizando

Escherichia coli (Yin *et al.*, 2007).

Células procarióticas podem ser facilmente manipuladas geneticamente, além de possuírem curto tempo de geração (rápido crescimento celular), baixo custo de produção, uma vez que não necessitam de meios de cultivo complexos, e alta produtividade. No entanto, a produção nesses organismos apresenta algumas desvantagens.

A maioria dos seres procarióticos apresenta baixa capacidade de secreção do produto de interesse, levando ao acúmulo intracelular do mesmo, aumentando a probabilidade de degradação por proteases celulares. Este problema pode ser evitado quando as proteínas são produzidas como corpos de inclusão, que são estruturas densas de polipeptídeos insolúveis não enovelados corretamente. Nesse caso, para a recuperação do produto, são necessárias a solubilização desses agregados insolúveis e etapas posteriores de reenovelamento (Qoronfleh *et al.*, 2007).

Outra limitação diz respeito aos códons encontrados nos genes humanos que codificam as proteínas terapêuticas. O código genético possui sessenta e um códons que correspondem a apenas vinte aminoácidos, ou seja, códons diferentes codificam o mesmo aminoácido. Mutações no DNA de uma proteína que não afetam a sua seqüência de aminoácidos são conhecidas como mutações silenciosas. Entretanto, mesmo que códons sinônimos codifiquem o mesmo aminoácido, esses códons são utilizados com frequências diferentes em diversos organismos. A utilização de códons reconhecidos por diversas moléculas de RNAt pode levar a uma tradução mais eficiente das proteínas e com menos erros do que a utilização de códons raros (Hershberg & Petrov, 2008).

O problema da utilização de códons raramente encontrados em *E. coli* (expostos na Tabela 1) pode ser contornado tanto pela utilização de mutagênese sítio dirigida, para gerar códons mais frequentes, ou pela co-expressão de genes que codifiquem RNAt raros em *E. coli*. Uma alternativa mais recentemente desenvolvida consiste na utilização de genes sintéticos, construídos a partir da otimização de códons, adotando-se códons de alta frequência na célula hospedeira.

Tabela 1: Códons raramente encontrados em *E. coli* (adaptado de Burgess-Brown *et al.*, 2008).

Aminoácidos	Códons raros
Arginina	AGG, AGA, CGG, CGA
Leucina	CUA, CUC
Isoleucina	AUA
Serina	UCG, UCA, AGU, UCC
Glicina	GGA, GGG
Prolina	CCC, CCU, CCA
Treonina	ACA

Estes sistemas também não são capazes de realizar as modificações pós-traducionais, como a glicosilação e a carboxilação, que muitas vezes são essenciais para a atividade biológica das proteínas, como será melhor discutido no item 1.7.

1.6 SISTEMAS DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICOS

1.6.1 LEVEDURAS

Devido ao seu grande potencial industrial, as leveduras, utilizadas há milhares de anos em processos fermentativos para a produção de gêneros alimentícios como o pão, o vinho e a cerveja, começaram a ser estudadas como possíveis produtoras de proteínas heterólogas.

Esses organismos apresentam diversas características moleculares, genéticas e bioquímicas muito semelhantes aos seres eucarióticos superiores e, portanto, vêm se mostrando uma excelente alternativa para a produção de biofármacos. Atualmente, os organismos mais estudados são as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*.

As leveduras, assim como *E. coli*, são facilmente cultivadas com ótimos níveis de expressão, crescem rapidamente e em meios quimicamente definidos, estando associadas a um baixo custo de produção. No entanto, diferentemente de *E. coli*, elas são capazes de secretar os produtos sintetizados para o meio extracelular e de realizar a *N*-glicosilação. Cabe ressaltar que os *N*-glicanos sintetizados pelas leveduras diferem drasticamente daqueles produzidos pelas células humanas, como será posteriormente discutido no item 1.7.

Nos últimos anos, células de *Pichia pastoris* vêm sendo modificadas, através de manipulação genética, para a inserção de genes que codificam a maquinaria necessária ao processo de *N*-glicosilação humano, ou seja, de genes que codificam diversas manosidases e glicosiltransferases, resultando em produtos com estrutura próxima à de proteínas humanas nativas.

Li *et al.* (2006) obtiveram sucesso na produção de anticorpos humanos recombinantes, com *N*-glicanos com padrão de glicosilação humano, produzidos em uma linhagem de *Pichia pastoris* glicoengenheirada. Segundo os autores, essas células seriam uma alternativa à utilização de células de mamíferos, cujo produto gerado apresenta um padrão de glicosilação semelhante ao humano, porém não idêntico. Outra vantagem apresentada é que, enquanto as células de mamífero produzem uma mistura de glicofomas e normalmente não permitem o controle da glicosilação, as leveduras engenheiradas produzem glicoproteínas uniformes, permitindo controle total sobre a glicosilação.

1.6.2 FUNGOS FILAMENTOSOS

O gênero *Aspergillus* é o maior e mais diverso gênero de fungos filamentosos, com cerca de cento e oitenta espécies, dentre as quais se destacam algumas espécies utilizadas para a geração de produtos com alto valor agregado. Uma das vantagens de sua utilização é a ampla faixa de temperatura de crescimento, de 10 a 50 °C, e de valores de pH, variando de 2 a 11. Além disso, é capaz de secretar o produto de interesse de maneira contínua e, por possuir uma morfologia filamentosa, permite a separação das células através de filtração simples (Lubertozzi & Keasling, 2009).

Existem relatos de altas produções utilizando fungos filamentosos como a de quimotripsina bovina (1.1 g/L) e lactoferrina humana (2 g/L), produzidas por *Aspergillus awamori*, e do anticorpo monoclonal Trastuzumab (0.9 g/L). No entanto, o rendimento de algumas proteínas heterólogas tem sido, comparativamente, muito baixo. Parte disso se deve ao enorme número de proteases produzidas e secretadas naturalmente pelos fungos (Demain & Vaishnav, 2009).

Os fungos filamentosos, assim como as leveduras, possuem a maquinaria necessária ao processamento das proteínas e, portanto, também podem vir a ser utilizados como sistemas de expressão para proteínas recombinantes de uso terapêutico. No entanto, até o momento, não há um conhecimento profundo relacionado ao genoma e ao metabolismo dos fungos filamentosos.

1.6.3 CÉLULAS DE INSETO

As células de inseto normalmente utilizadas para expressão de proteínas heterólogas são células originadas de lepidópteros (ordem de insetos que engloba as borboletas e mariposas), sendo a principal delas a Sf9, originada de *Spodoptera frugiperda*. O vetor de expressão utilizado nessas células é um baculovírus portando o gene de interesse, que é naturalmente capaz de infectar células de inseto (Tomita *et al.*, 2004).

Proteínas heterólogas são expressas, em sua maioria, sob controle do promotor viral poliedrina, um promotor forte, que leva a uma alta expressão da proteína de interesse, normalmente muito superior à obtida em células de mamíferos. Entretanto, o baculovírus realiza uma infecção lítica, ou seja, um grande número de células é lisada com o tempo, liberando as proteases no meio de cultivo (Altmann *et al.*, 1999).

O processo de *N*-glicosilação em células de inseto e células humanas apresenta algumas diferenças importantes, o que pode levar a imunogenicidade das moléculas produzidas por este sistema, como será abordado no item 1.7.

1.6.4 PLANTAS

O desenvolvimento mais recente de plantas transgênicas, nas quais as vias de glicosilação foram alteradas a fim de gerarem oligossacarídeos humanizados, vem abrindo caminho para a utilização destas como possíveis sistemas de expressão de proteínas terapêuticas. Esses sistemas teriam como vantagem o fato de apresentarem um baixo custo de produção, alta qualidade e segurança (Yin *et al.*, 2007).

A possibilidade de direcionar a produção de proteínas recombinantes para órgãos específicos também é uma vantagem da utilização de plantas como sistemas de expressão, permitindo alternativas de estocagem e vias de administração. A produção em sementes, por exemplo, gera proteínas extremamente estáveis, prontas para serem estocadas e, posteriormente, extraídas e purificadas facilmente (Karg & Kallio, 2009).

Sua principal vantagem sobre sistemas mais amplamente utilizados, como leveduras e *E. coli*, é a sua capacidade de realizar a grande maioria das modificações pós-traducionais necessárias para a atividade biológica e farmacocinética (Gomord & Faye, 2004).

Apesar das vantagens evidentes, a produção de proteínas recombinantes em plantas apresenta algumas desvantagens tais como a baixa eficiência de transformação e expressão, a dificuldade na regeneração dos sistemas produtivos, uma vez que o crescimento de diversas espécies é sazonal, além das diferenças existentes no padrão de *N*-glicosilação de plantas e humanos (ver item 1.7) (Yin *et al.*, 2007).

1.6.5 ANIMAIS TRANSGÊNICOS

Atualmente, apenas um produto produzido em animais transgênicos foi aprovado para uso em humanos. Trata-se da anti-trombina III recombinante humana (Atryn®), produzida pela empresa GTC Biotherapeutics, aprovada pela agência regulatória da União Européia, o EMEA, em 2006 (Ledford, 2006).

A pesquisa relacionada à utilização de animais transgênicos para a produção de biofármacos se desenvolveu nas últimas duas décadas, devido aos avanços nas técnicas de biologia molecular e reprodutivas. As primeiras pesquisas se baseavam em técnicas de micro-injeção de DNA para a produção de proteínas recombinantes no leite. Desde então, a produção, principalmente no leite, vem se desenvolvendo e novas alternativas como o sangue, a urina e o líquido seminal estão sendo investigadas. A utilização de animais de granja, como as galinhas, também vem se mostrando interessante, com expressão do transgene direcionada para a clara de ovo (Kind & Schnieke, 2008).

A técnica de micro-injeção de DNA vem sendo utilizada há anos, porém a sua eficiência na geração de animais transgênicos é muito baixa, entre 1 e 5%. A utilização de técnicas mais modernas, como os vetores retrovirais, oferece uma eficiência superior a 75%, mas a utilização

dessa técnica se restringe a genes de tamanho pequeno e por isso sua utilização é bastante limitada (Kind & Schnieke, 2008).

Para contornar essas limitações, foi desenvolvida a modificação genética através da transferência de núcleos de células somáticas (Wilmut *et al.*, 1997). Atualmente, este é o método mais utilizado para gerar animais transgênicos de grande porte e foi o método utilizado na produção do Atryn®.

A vantagem da utilização de animais sobre a cultura de células é a alta produtividade, da ordem de gramas de proteínas por litro de leite (Rudolph, 1999). No entanto, algumas proteínas, como a EPO, não podem ser produzidas em animais, uma vez que se forem expressas fora do tecido de interesse, no caso a glândula mamária, ou alcançarem a circulação sanguínea de alguma outra forma, podem causar dano à saúde do animal.

Outras barreiras à produção de proteínas terapêuticas em animais são o risco de zoonoses e contaminação com proteínas indesejadas, assim como a dificuldade de uma caracterização adequada do animal produtor, exigida pelos órgãos regulatórios internacionais como EMEA e FDA.

1.6.6 CÉLULAS DE MAMÍFERO

Os sistemas de expressão em células de mamíferos, quando comparados aos demais sistemas anteriormente expostos, se destacam por serem capazes de processar, secretar e glicosilar as proteínas de maneira correta.

A linhagem celular imortalizada CHO foi estabelecida em 1957 a partir de uma cultura primária de células ovarianas de hamster chinês, *Cricetulus griseus* (Hacker *et al.*, 2009). Atualmente, esta linhagem celular é a hospedeira predileta para a produção de glicoproteínas terapêuticas. A linhagem CHO oferece diversas vantagens, incluindo o profundo conhecimento a seu respeito, desenvolvido com anos de pesquisa, o que permite uma manipulação mais fácil e segura, além da sua capacidade de produzir proteínas com *N*-glicanos bastante similares aos encontrados em proteínas endógenas humanas.

As desvantagens da utilização de células CHO estão relacionadas às características gerais de células de mamíferos: sua fragilidade mecânica (à agitação), crescimento lento, necessidade de meios de cultivo complexos e baixa produtividade, levando a altos custos de produção.

Os recentes avanços realizados com relação às células CHO estão focados no aumento da produtividade celular específica, através do desenvolvimento das ferramentas de biologia molecular, e no prolongamento do tempo de vida da célula em cultura, ou seja, a obtenção de altas concentrações de células viáveis. Desta maneira, foi possível o aumento dos níveis de expressão de proteínas recombinantes por essas células, alcançando-se produtividades volumétricas de 5 g/L sob

condições controladas de cultivo (Durocher & Butler, 2009). Algumas das estratégias atualmente utilizadas estão apresentadas a seguir.

1.6.6.1 INTEGRAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA

As recombinases sítio específicas Cre (responsável pela recombinação genômica no bacteriófago P1) e Flp (denominada desta forma por sua habilidade de inverter ou fazer um "flip" em segmentos de DNA na levedura *Saccharomyces cerevisiae*) são capazes de recombinar seqüências específicas de DNA em determinados sítios específicos, chamados *loxP* (*locus* de *crossover* (x) em P1) e FRT (sítio de reconhecimento da recombinase Flp), respectivamente.

Essas duas enzimas fazem parte de uma família de recombinases sítio-específicas que compartilham de um mesmo mecanismo de recombinação do DNA, que envolve a clivagem, troca e ligação dos fragmentos. A estrutura básica é formada por duas seqüências invertidas imperfeitas com 13 pares de base, separadas por um núcleo central assimétrico de oito pares de base. Na presença de dois sítios de reconhecimento, os monômeros da recombinase se ligam às seqüências palindrômicas, promovem a formação de um complexo e, então, ocorre a recombinação entre os dois sítios, conforme apresentado na Figura 6.

A maioria das técnicas existentes para transfecção estável de genes heterólogos no genoma de mamíferos está associada à integração aleatória no cromossoma da célula hospedeira. Essa falta de controle sobre o número de cópias e sobre a posição de integração das moléculas no cromossoma resulta em um padrão de expressão imprevisível. Isto acaba afetando não somente o nível de expressão e a estabilidade em longo prazo, mas também pode levar à desestabilização de genes nativos vizinhos (Wirth *et al.*, 2007).

Dentro dessa perspectiva, foram desenvolvidas estratégias que se utilizam das recombinases para gerar um sistema de integração sítio dirigida, no qual apenas uma cópia do gene é inserida em um local pré-determinado de alta atividade transcricional.

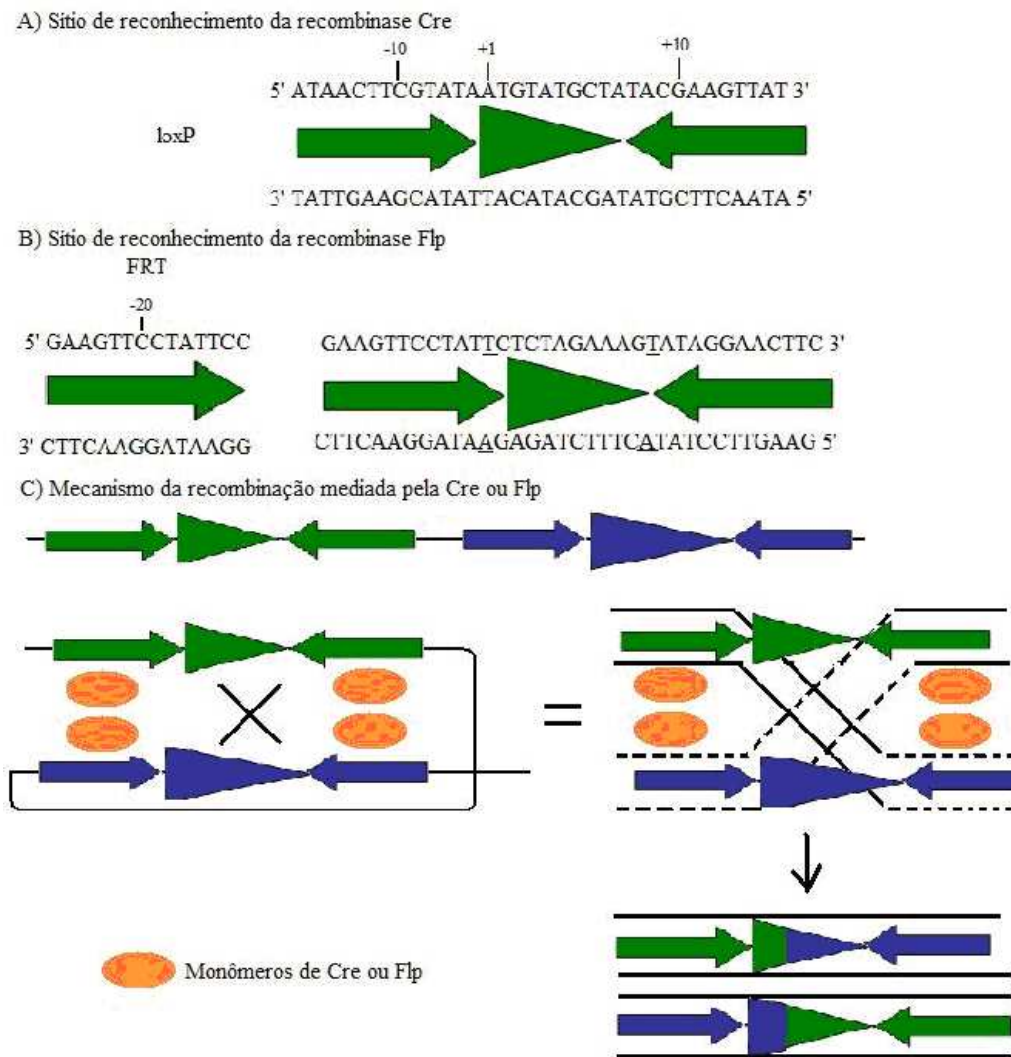


Figura 6: Sítios de reconhecimento das recombinases Cre e Flp e o mecanismo de recombinação. (A) O sítio de reconhecimento da recombinase Cre é conhecido como *loxP*. (B) O sítio de reconhecimento da recombinase Flp é chamado FRT. (C) Complexo formado entre as moléculas de recombinase (Cre e Flp) e dois sítios de reconhecimento idênticos (representados pelas cores verde e azul). Um monômero da recombinase se liga a cada seqüência palindrômica de 13 pb, enquanto a seqüência espaçadora de 8pb fornece o local de clivagem, substituição e ligação. No produto final, obtém-se o DNA resultante da recombinação entre os dois sítios de reconhecimento (adaptado de Branda & Dymecki, 2004).

Primeiramente, as células são submetidas à transfecção com um vetor contendo um gene repórter flanqueado por sítios de reconhecimento das recombinases (sítios FRT ou *loxP*). A integração desse primeiro vetor ocorre de maneira aleatória. O transfectoma estável é, então, analisado para a seleção dos clones que expressem o gene repórter em níveis elevados. O melhor clone selecionado torna-se a célula parental para as próximas transfecções. Em seguida, é realizada uma nova transfecção com o vetor contendo o gene de interesse e o sítio de reconhecimento da recombinase. Na presença da recombinase, ocorrerá a troca do gene repórter previamente integrado no cromossoma, pelo gene de interesse, presente no vetor. Desta maneira, o gene de interesse é integrado em uma região altamente transcrita e, conseqüentemente, será altamente expresso.

1.6.6.2 SEQUÊNCIA DE KOZAK

Em 1986, Kozak realizou um estudo sobre o efeito de substituições pontuais ao redor do códon de iniciação, ATG, no gene da preproinsulina e identificou que a sequência ótima para a iniciação nos ribossomos em eucarióticos é **GCCA/GCCAUGG**.

Nessa sequência consenso, a purina na posição -3 é o nucleotídeo mais conservado e, funcionalmente, é a posição mais importante. A importância das bases A ou G (sendo a base A um pouco melhor que a G) na posição -3 foi provada por experimentos de mutagênese em uma ampla variedade de genes.

O G na posição +4 também é altamente conservado e, especialmente na ausência do A na posição -3, tem uma forte contribuição. Sequências similares ao padrão **GCCA/GCCAUGG** também são efetivas, sem maiores consequências, desde que as posições -3 e +4 sejam mantidas (Kozak, 1986).

Para proteínas que apresentam mais de um códon de iniciação funcional, os experimentos de mutagênese anteriormente mencionados definem duas possíveis condições: (i) quando o primeiro códon ATG aparece em um contexto forte (AXXatgX ou GXXatgG), todos ou praticamente todos os ribossomos se iniciam nesse ponto; (ii) quando o primeiro ATG está em um contexto fraco, sem uma purina na posição -3 e G na posição +4, alguns ribossomos se iniciam naquele ponto, mas a maioria continua a leitura e se inicia mais adiante. Essa diferença no códon de iniciação leva à formação de duas proteínas diferentes, geradas por um mesmo RNAm (Kozak, 2002).

1.7 PRINCIPAL PATENTE RELACIONADA À PRODUÇÃO DE GBA

A principal patente relacionada à produção da glucocerebrosidase depositada pela empresa Genzyme nos Estados Unidos, número 5.236.838 de 17 de agosto de 1993, caracteriza as células utilizadas para a produção da enzima, assim como os níveis de produção alcançados.

A célula recombinante utilizada no processo produtivo foi gerada a partir da transfecção da linhagem CHO.K1 com um vetor multicistrônico. A grande maioria dos RNAs presentes em células animais é monocistrônico, ou seja, codifica a síntese de apenas uma proteína. No entanto, dois ou mais genes podem ser expressos por um mesmo promotor, gerando um RNAm multicistrônico, quando utilizamos elementos denominados IRES (sítio de entrada interna de ribossomo), sequências capazes de promover a tradução das unidades transcricionais de maneira independentemente do *cap* (Bollati-Fogolín & Comini, 2008).

A expressão concomitante de dois genes heterólogos, como no caso da patente, pode ser muito útil para o estabelecimento de uma população celular estável. Este processo é realizado através da introdução de um vetor contendo o gene do produto de interesse, um elemento IRES e um outro gene com um marcador de seleção, como ilustrado na Figura 7 (Makrides, 1999).

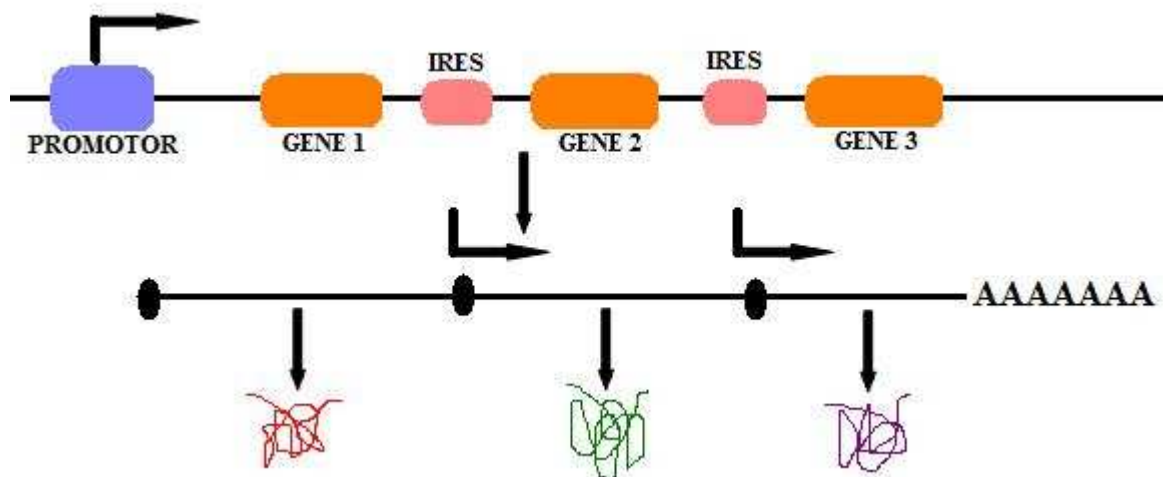


Figura 7: Vetor multicistrônico. O elemento IRES permite a transcrição de múltiplos gene em um único RNAm (adaptado de Makrides, 1999).

O sistema de amplificação gênica conhecido em células de mamíferos é o da dihidrofolato redutase (DHFR). Essa técnica foi utilizada para a produção de diversas proteínas recombinantes em escala industrial nos anos 80, como a glucocerebrosidase, com o objetivo de atender a necessidade de aumento da produtividade em células de mamífero.

A amplificação gênica é realizada em duas etapas principais. A primeira delas consiste na introdução de um vetor contendo tanto o gene de seleção, no caso a DHFR, quanto o gene que codifica o produto de interesse, no caso o gene da GBA. Esse vetor é introduzido em uma linhagem celular mutante, deficiente na enzima codificada pelo gene de seleção, as células DHFR⁻. Normalmente, este vetor possui outro marcador de seleção, que confere a célula resistência a antibióticos como neomicina e higromicina, para facilitar a seleção de uma população estavelmente transfectada.

A segunda etapa é a amplificação gênica propriamente dita. A linhagem celular que sobreviveu a primeira seleção, realizada com os antibióticos, deve conter uma cópia ou um pequeno número de cópias dos genes transfectados. Neste momento, indutores da amplificação gênica são adicionados ao meio de cultivo. No caso do sistema com o DHFR, o indutor utilizado é o metotrexato (MTX), um análogo do dihidrofolato, que inibe a DHFR e mata rapidamente as células em crescimento. Sendo assim, para sobreviver, as células são obrigadas a amplificar o gene da DHFR em seu genoma, a fim de aumentar sua expressão e, conseqüentemente aumentar também o número de cópias do gene de interesse, como mostra a Figura 8 (Omasa T, 2002).

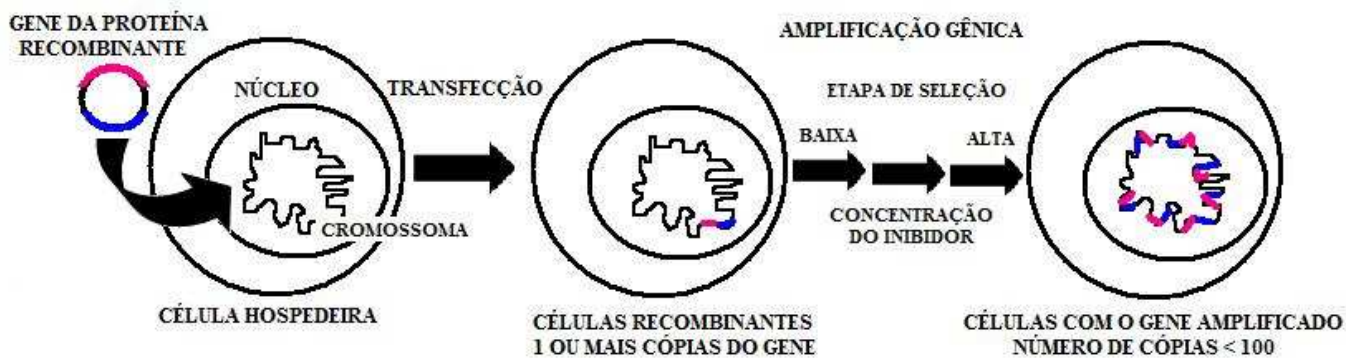


Figura 8: Síntese do processo para a construção de uma linhagem de alta expressão através de um processo de amplificação gênica. Centenas de bases próximas a região cromossômica na qual o gene de amplificação se encontra também são amplificadas (adaptado de Omasa, 2002).

Desta maneira, a célula utilizada para a produção comercial da glucocerebrosidase recombinante apresenta múltiplas cópias do gene que a codifica. A cultura realizada no processo produtivo chega a níveis de produção que variam de 1 a 20 mg de GBA por litro de meio de cultivo, variando de acordo com a densidade celular e as condições de cultura. Para que o processo prossiga é necessária que a atividade enzimática mínima seja de 10^6 unidades por mg de GBA recombinante.

1.8 GLICOSILAÇÃO

Os principais sistemas de expressão utilizados atualmente para a obtenção de produtos biofarmacêuticos para uso em humanos são as linhagens de células de mamíferos, bactérias, leveduras e células de insetos. No entanto, esses sistemas apresentam diversas limitações relacionadas à incorporação de modificações pós-traducionais encontradas nas proteínas humanas nativas.

Dentre as modificações pós-tradução existentes, a mais importante delas é a glicosilação, que consiste na adição de oligossacarídeos (*N*- ou *O*-glicanos) à cadeia de aminoácidos das proteínas. As glicoproteínas representam mais de um terço dos biofármacos atualmente aprovados pelas agências regulatórias (Walsh & Jefferis, 2006).

Os *N*-glicanos contêm um pentassacarídeo central (também conhecido como *core*), formado por três resíduos de manose e dois resíduos de *N*-acetil-glicosamina, ligados através de uma ligação *N*-glicosídica a um resíduo de asparagina presente em uma seqüência consenso de aminoácidos do tipo Asn-X-Ser/Thr, na qual Asn = asparagina, X = qualquer resíduo de aminoácido com exceção de prolina, Ser = serina e Thr = treonina (Butler, 2008). A representação desta estrutura se encontra na Figura 9.

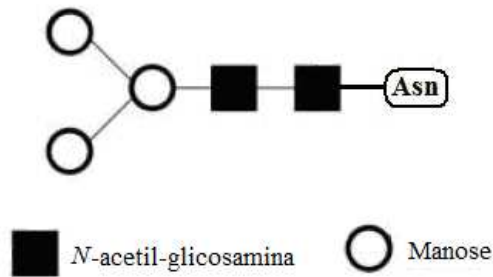


Figura 9: Representação da estrutura central dos oligossacarídeos presentes nos *N*-glicanos. A ligação ocorre entre o resíduo de glicosamina e a asparagina da sequência consenso Asn-X-Ser/Thr.

O processo de *N*-glicosilação ocorre em diversas etapas. A etapa inicial da modificação das proteínas é a transferência em bloco de um oligossacarídeo formado por dois resíduos de *N*-acetil-glicosamina, nove resíduos de manose e três resíduos de glicose ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$), durante o processo de tradução, por ação da enzima oligossacaril transferase (OST).

Essa cadeia de oligossacarídeos sofre diversas modificações em sua estrutura pela ação de glicosidases e manosidases durante sua migração pelo retículo endoplasmático (RE) e pelo complexo de Golgi, como mostra a figura abaixo (Butler, 2008).

O processo de *N*-glicosilação das glicoproteínas no retículo endoplasmático e complexo de Golgi se encontra sintetizado na Figura 10.

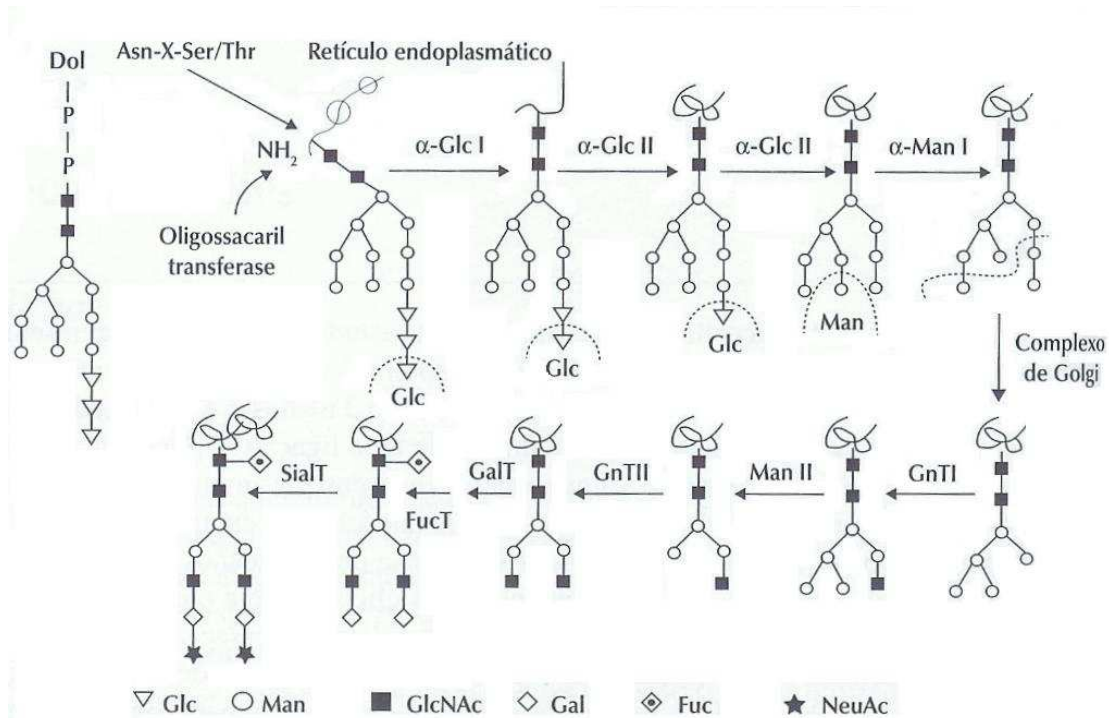


Figura 10: Uma visão geral sobre a biossíntese das cadeias laterais de *N*-glicanos em proteínas. Quando a glicoproteína está sendo formada entra no RE, o oligossacarídeo pré-formado é ligado co-traducionalmente a resíduos de asparagina que façam parte da seqüência consenso Asn-X-Ser/Thr. A biossíntese desse precursor, sua ligação ao resíduo de asparagina e as etapas subsequentes de seu processamento no RE e complexo de Golgi são realizadas por uma série de glicosidases e glicosiltransferases (Reproduzido de Butler, 2008).

O perfil das enzimas presentes na célula vai definir a composição e estrutura da cadeia oligossacarídica final, que normalmente é descrita como complexa, altamente manosilada ou do tipo híbrida. A secreção em diversos estágios da biossíntese dos *N*-glicanos leva à obtenção de diferentes glicoformas a partir de uma mesma célula (Figura 11).

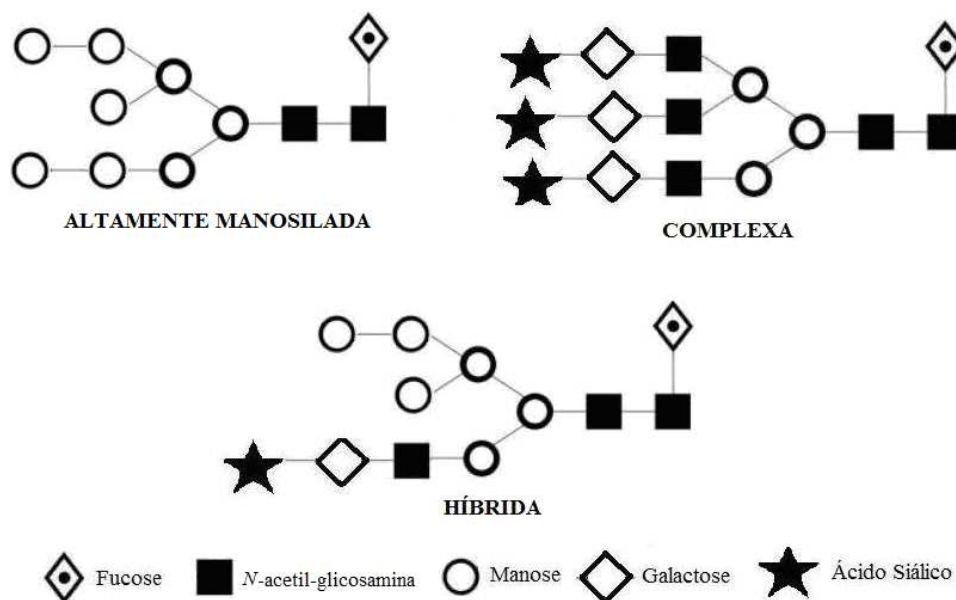


Figura 11: Estruturas das cadeias dos oligossacarídeos. Estas são normalmente subdivididas em três grupos: altamente manosilada, complexas ou híbridas.

As outras estruturas glicosídicas existentes são os *O*-glicanos. Diferentemente da *N*-glicosilação, os *O*-glicanos são adicionados à proteína após a sua tradução, quando esta já está completamente enovelada (Schachter, 2000).

Sua estrutura clássica é formada pela ligação dos oligossacarídeos à proteína através de um resíduo de α -*N*-acetil-galactosamina (GalNAc) ao grupo hidroxil da cadeia lateral dos resíduos de serina (Ser) ou treonina (Thr). No entanto, existem outras opções estruturais mais raras, contendo *O*-fucose, *O*-glicose ou *O*-manose. A formação da ligação GalNAc- α -*O*-Ser/Thr é catalisada por uma enzima chamada α -*N*- acetil-galactosamina-transferases (GalNAcT) (Schachter, 2000).

Esse tipo de estrutura apresenta um menor impacto na estrutura funcional das glicoproteínas, quando comparado à *N*-glicosilação. Sendo assim, neste trabalho somente a *N*-glicosilação será discutida em maior profundidade.

1.8.1 MICRO E MACRO-HETEROGENEIDADE

Glicoproteínas produzidas em um mesmo sistema de expressão podem apresentar distintos padrões de glicosilação, gerando uma mistura de isoformas. Essas variações no número de sítios glicosilados e nas estruturas dos oligossacarídeos encontrados são denominadas macro-

heterogeneidade e micro-heterogeneidade, respectivamente (Butler, 2008).

Normalmente, 60% de todas as seqüências consenso (sítios de *N*-glicosilação Asn-X-Ser/Thr) presentes em uma glicoproteína estão ocupadas e, até o momento, não existe uma explicação concreta para determinar porque a glicosilação não ocorre de maneira uniforme em toda a molécula. Entretanto, alguns fatores como a taxa de tradução protéica, a disponibilidade de doadores de oligossacarídeos e a atividade da enzima OST parecem ter influência nesse processo (Ben-Dor *et al.*, 2004).

Para que a *N*-glicosilação ocorra de maneira eficiente, é necessário que a enzima OST consiga acessar facilmente os sítios de glicosilação. A presença de pontes dissulfeto e a conformação da cadeia polipeptídica próxima ao sítio de *N*-glicosilação podem influenciá-la. Na molécula do ativador do plasminogênio tecidual, conhecido como tPA, por exemplo, a formação da ponte dissulfeto durante o enovelamento do peptídeo inibe a *N*-glicosilação, muito provavelmente por impedimento estérico, já que a enzima OST não tem acesso à seqüência consenso (Walmsley & Hooper, 2003).

Outro fator aparentemente determinante é o local no qual o sítio de *N*-glicosilação se encontra na cadeia polipeptídica. Sítios mais próximos à extremidade *N*-terminal da proteína são normalmente mais glicosilados do que os sítios que se encontram mais próximos à extremidade *C*-terminal. A distância crítica relativa à redução da ocupação de glicanos parece ser de aproximadamente 65 resíduos de aminoácidos a partir da extremidade *C*-terminal. Como essa distância corresponde à distância entre o sítio P do ribossomo e o sítio ativo da enzima OST, existe a hipótese de que a cadeia protéica não se encontraria disponível para a ligação dos *N*-glicanos após ter se desacoplado do ribossomo (Walmsley & Hooper, 2003).

As reações catalisadas pelas transferases presentes no complexo de Golgi nem sempre são completamente realizadas, fazendo com que ocorra uma heterogeneidade na estrutura final dos glicanos. Essa micro-heterogeneidade pode ser verificada pela variação no número de cadeias ramificadas a partir da estrutura central (*core*), oscilando tipicamente entre duas cadeias (estrutura bi-antênaria) e quatro (estrutura tetra-antênaria). Outras variações comumente encontradas se referem à adição do ácido siálico às extremidades das antenas e à adição de fucose à molécula de GlcNAc mais interna da estrutura central (Hossler *et al.*, 2007).

As diferentes glicoformas podem ser classificadas em três categorias, baseadas no impacto em sua eficácia terapêutica: glicanos que afetam a meia-vida plasmática da proteína, glicanos que afetam o direcionamento da proteína para algum tecido específico e glicanos que modulam a atividade biológica (Lawrence *et al.*, 2001). Com base nesses parâmetros, é possível definir qual a estrutura glicosilada desejada e, desta maneira, escolher o sistema de expressão no qual a proteína deve ser produzida.

1.8.2 GLICOSILAÇÃO EM DIVERSOS SISTEMAS DE EXPRESSÃO

Os sistemas de expressão procarióticos não são capazes de realizar modificações pós-traducionais como, por exemplo, a glicosilação, pois não possuem a maquinaria enzimática necessária a tal processo. Assim, grande parte das proteínas produzidas nesse sistema não alcança sua conformação ativa. Nesses casos, é necessária a utilização de um sistema de expressão mais complexo (eucariótico).

Já as leveduras e os fungos filamentosos são capazes de realizar modificações pós-tradução como a glicosilação. No entanto, a estrutura glicosilada obtida em seres eucarióticos superiores e inferiores difere significativamente. A etapa de transferência do oligossacarídeo $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ à proteína que está sendo transcrita e a remoção de três resíduos de glicose e um resíduo de manose, gerando $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$, são bem conservadas em todos os eucariotos, porém as etapas seguintes não.

Nas etapas subsequentes que ocorrem no complexo de Golgi, os *N*-glicanos sofrem modificações que variam bastante entre as espécies. Nos fungos, a estrutura típica do oligossacarídeo formado é hipermanosilada, com a adição de até 100 resíduos de manose, enquanto, em mamíferos, a estrutura de oligossacarídeos sofre clivagem dos resíduos de manose, seguida da adição de resíduos de *N*-acetil-glicosamina, galactose, fucose e ácido siálico, como mostra a Figura 12 (Bobrowicz *et al.*, 2004).

Os *N*-glicanos produzidos por células de insetos são, em sua maioria, do tipo paucimanosídicos, ou seja, possuem poucos resíduos de manose, e uma minoria é formada por estruturas hipermanosiladas. O *N*-glicano precursor $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ é adicionado aos sítios de glicosilação e depois convertido a $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9$. No entanto, apesar de grande parte das glicoproteínas produzidas por células de lepidópteros sofrer modificações adicionais em seus glicanos, uma parte delas mantém essa estrutura bastante manosilada (Gouveia *et al.*, 2009).

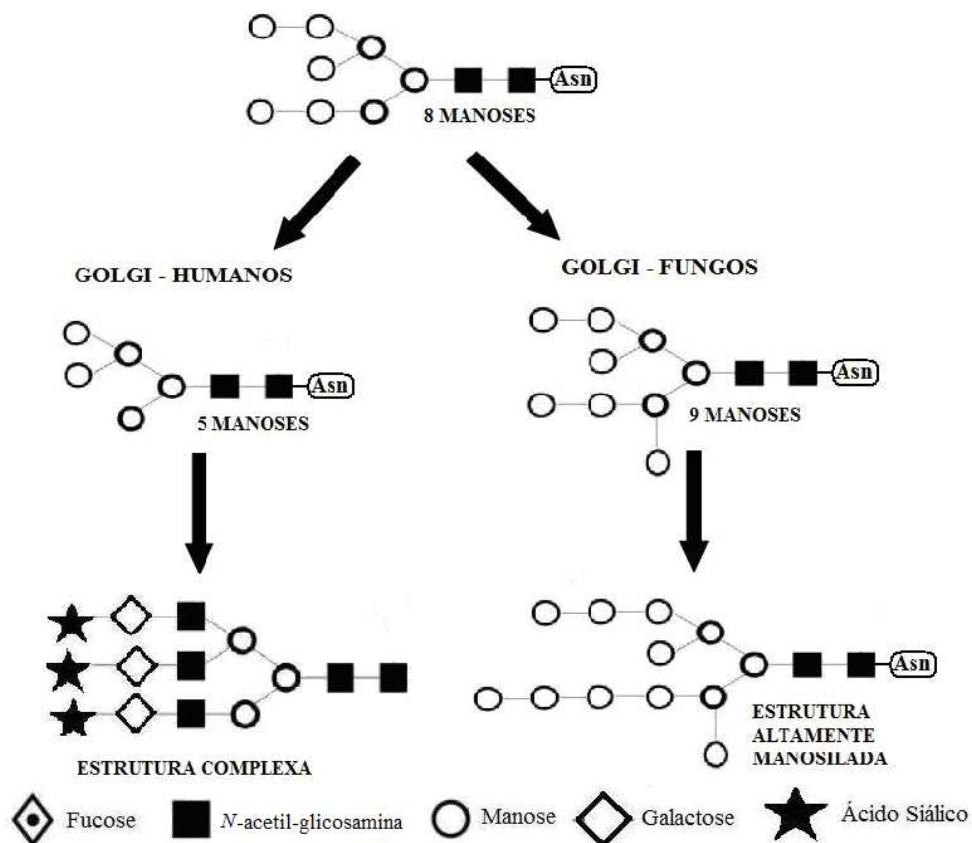


Figura 12: Diferenças entre as vias de *N*-glicosilação em humanos e em fungos. A diferença ocorre somente nas etapas que acontecem no complexo de Golgi. Em humanos, o oligossacarídeo formado é do tipo complexo, já nos eucarióticos inferiores é formada uma estrutura hipermanosilada (Adaptado de Bobrowicz *et al.*, 2004).

O processamento dos oligossacarídeos, em células de lepidópteros, em estruturas mais complexas e menos manosiladas ocorre através da ação das enzimas α -glicosidase I e II e da $\alpha(1,2)$ -manosidase, gerando $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$. A enzima *N*-acetil-glicosamina-transferase-I (GnT I) também apresenta alta atividade nessas células e, assim como nas células de mamíferos, apenas um resíduo de GlcNAc é adicionado ao resíduo de Manose- α -1,3 do oligossacarídeo $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$.

A presença de α -manosidase II também foi confirmada nessas células, sendo responsável pela retirada dos resíduos de manose $\alpha(1,3)$ e $\alpha(1,6)$, gerando $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$. Já a enzima *N*-acetil glicosamina transferase II (GnT II) apresenta uma atividade residual, normalmente inferior a 1%, nas células de lepidópteros. Como essa enzima é responsável pela formação da ramificação, pode-se dizer que, em geral, as células de inseto não são capazes de produzir estruturas de glicanos multi-antênárias. Nas células de mamíferos, os resíduos terminais de GlcNAc sofrem a ação da enzima $\beta(1,4)$ -galactosil-transferase-I (GalT I). No entanto, *N*-glicanos galactosilados são raramente encontrados em glicoproteínas produzidas em células de inseto. Já a enzima sialil-transferase parece realmente não estar presente nas células de lepidópteros (Tomiyal *et al.*, 2004).

Os *N*-glicanos produzidos nessas células podem sofrer modificações pelas enzimas $\alpha(1,3)$ e $\alpha(1,6)$ -fucosil-transferase, que adicionam um resíduo de fucose, através de ligação α -1,6 ou α -1,3 e

α -1,6, ao resíduo de GlcNAc ligado à asparagina. A estrutura, na qual a fucose é ligada por meio de ligação α -1,3 ao resíduo de GlcNAc do núcleo central, é inexistente nos mamíferos e, portanto, a sua presença em uma glicoproteína de uso terapêutico não é permitida por ser altamente imunogênica (Tomiyal *et al.*, 2004).

As etapas realizadas no complexo de Golgi tardio diferem entre mamíferos e plantas. Enquanto nos mamíferos se observa a adição da fucose ligada α -1,6 ao núcleo central e de ácidos siálicos ao final das cadeias ramificadas, nas plantas a fucose é ligada por meio de ligação α -1,3 ao núcleo central e são encontrados resíduos de β (1,2)-xilose (Gomord & Faye, 2004).

A formação de oligossacarídeos com a adição de um açúcar como a xilose e a existência de uma ligação α -1,3 da fucose, ambos eventos inexistentes em mamíferos, faz com que não seja possível a utilização de plantas como sistema de escolha para a produção de proteínas recombinantes de uso terapêutico, pois essas diferenças estruturais são capazes de provocar reações imunológicas severas (Gomord & Faye, 2004).

As proteínas obtidas em animais transgênicos são bastante semelhantes às produzidas em cultura de células animais, apresentam padrão de glicosilação e de modificações pós-tradução semelhantes, com pequenas variações dependendo da espécie utilizada.

Enquanto as células humanas não são capazes de sintetizar o ácido *N*-glicolil-neuramínico (Neu5Gc), muitas das glicoproteínas produzidas em células CHO podem apresentar as duas formas de derivados do ácido siálico, tanto o ácido *N*-acetil-neuramínico (NeuAc) quanto o ácido *N*-glicolil-neuramínico (Sethuraman & Stadheim, 2006). Os humanos não produzem Neu5Gc devido a uma mutação pontual no gene que codifica a citidina-mono-fosfato-ácido-*N*-glicolil-neuramínico hidroxilase (Byrne *et al.*, 2007).

Os glicoconjugados que contêm esse tipo comum de ácido siálico são considerados "estranhos" ao organismo humano e podem induzir resposta imune, levando à formação dos chamados anticorpos de Hanganutziu-Deicher. O título desses anticorpos parece depender da apresentação do antígeno. Uma dose de EPO recombinante, por exemplo, contém 1% de Neu5Gc no total de ácidos siálicos e não produz resposta imune em humanos. Grande parte das linhagens de CHO produz glicoproteínas recombinantes com baixos níveis de Neu5Gc, cerca de 3% do total de ácidos siálicos (Chenua *et al.*, 2003). A presença desses baixos níveis de Neu5Gc, normalmente, não oferece riscos à saúde humana, sendo considerados seguros para uso humano.

A Tabela 2 apresenta os sacarídeos presentes e ausentes nas estruturas de glicoproteínas produzidas por linhagens CHO.

Tabela 2: Principais *N*-glicanos presentes e ausentes em proteínas recombinantes produzidas em linhagens CHO (adaptado de Grabenhorst *et al.*, 1999).

Estrutura do carboidrato	CHO
Fucose proximal	+
Fuc(α 1-2)Gal-R*	+
α 2,6-NeuAc	-
α 2,3-NeuAc	+
NeuAc(α 2-8)NeuAc α 2-3-R	+
NeuGly*	+
tri/tetra – antenas	+
repetições Gal(β 1-4)GlcNAc	+
Gal(β 1-3)GlcNAc – R	-
Glicanos sulfatados	+
Gal(α 1-3)Gal	+
repetições ramificadas	?
manose-6-fosfato*	+
GlcNAc bissectada	-
GalNAc(β 1-4)GlcNAc	-

*detectados em quantidades mínimas

Atualmente, já foram isoladas diversas linhagens celulares mutantes em enzimas relacionadas ao processo de *N*-glicosilação derivadas da linhagem celular CHO. A seleção de uma gama de mutantes é possível devido à variedade de lectinas existentes. Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que reconhecem especificamente certas conformações de açúcares, ou seja, são detectores sensíveis de estruturas específicas de carboidratos.

Diversas lectinas são citotóxicas e a primeira etapa relacionada a essa toxicidade é a ligação aos carboidratos presentes na superfície da célula. Desta maneira, isolar mutantes que expressam uma estrutura de carboidrato alterada é o mesmo que procurar por células resistentes a concentrações tóxicas de lectina (Stanley, 1983).

Em 1973, Raymond Baker isolou um clone denominado PRO⁻⁵, obtido a partir de uma população denominada Pro⁻ obtida de W. C. Dewey, que parecia diferir das células CHO.K1 em alguns aspectos genéticos. Em 2001, Lee *et al.* demonstraram que a linhagem CHO PRO⁻⁵ não expressa o gene β 4*GalT-6*, que codifica a β -4-galactosil-transferase-6. No entanto, a falta da atividade dessa enzima não parece influenciar o perfil de galactosilação dos *N*-glicanos produzidos pela célula, porém parece reduzir a proporção de ácido siálico nas estruturas bi-, tri- e tetra-antênarias.

Outra linhagem, a CHO mutante LEC1.3 foi isolada, em uma seleção realizada em apenas uma etapa a partir das células CHO PRO⁻⁵, pela resistência à leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L). Análises genéticas mostraram que essas e outras células CHO resistentes a lectinas isoladas possuem mutações no mesmo gene e passaram a ser denominadas mutantes LEC1 (Chen &

Stanley, 2003).

Mutantes desse grupo não possuem a forma ativa da enzima α -3-D-manosídeo β -1,2-*N*-acetil-glicosaminil-transferase I (GlcNAc-TI) e, conseqüentemente, não são capazes de sintetizar *N*-glicanos do tipo complexo e nem híbrido, gerando estruturas oligomanosídicas simples.

A mutação foi causada pela inserção de uma base, visto que o gene *Mgat1* que codifica a GlcNAc-TI na linhagem mutante possui uma citidina a mais do que o gene não mutado. Enquanto o *Mgat1* normal apresenta quatro citidinas dos nucleotídeos 702 a 705 (ACCCCT), o *Mgat1* presente na linhagem CHO LEC1.3 possui cinco citidinas, na forma ACCCCCT. Isso faz com que seja gerado um códon sem sentido após o aminoácido 235 e um códon de terminação após o aminoácido 244 da seqüência da GlcNAc-TI. Desta forma, a enzima é sintetizada de forma truncada e, portanto, inativa.

1.9 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a imiglicerase está na lista dos "Medicamentos Excepcionais" do Ministério da Saúde e, segundo a portaria SAS/MS nº 449, de 08 de julho de 2002, que dita o protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas que devem ser utilizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no tratamento da doença de Gaucher, os pacientes devem receber doses que variam entre 15 e 60 U/Kg a cada duas semanas, dependendo da idade e do quadro clínico apresentado (Ministério da Saúde, 2002).

Dados do Ministério da Saúde apontam gastos superiores a US\$ 125 milhões, somente no ano de 2007, com a compra da imiglicerase necessária para o tratamento de apenas quatrocentos e trinta pacientes na rede pública (Ministério da Saúde, 2007).

Sendo assim, fica clara a necessidade de investimentos e pesquisas que objetivem o desenvolvimento de um processo de clonagem e expressão em cultura de células animais eficaz, podendo dar origem a processos produtivos que viabilizem a produção da enzima em larga escala e com alto rendimento, diminuindo, assim, bruscamente os custos do processo de fabricação e, conseqüentemente, permitindo o acesso de mais pessoas ao tratamento.

II- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho consistiu na clonagem e expressão da β -glucocerebrosidase humana em células da linhagem CHO (ovário de hamster chinês), visando à seleção de clones capazes de produzir e secretar a β -glucocerebrosidase na sua forma ativa. Foram utilizados dois diferentes vetores de expressão, que promovem a integração do gene heterólogo ao genoma da célula hospedeira de forma aleatória (pcDNA3.1) ou sítio-específica (pcDNA5/FRT). Estes foram transfectados em quatro linhagens de células CHO distintas, cujo padrão de glicosilação, essencial para a atividade da enzima de interesse, varia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Construir vetores de expressão contendo o gene que codifica a β -glucocerebrosidase (GBA);
- ✓ Inserir os vetores recombinantes em diferentes linhagens de células CHO e manter pressão seletiva até a obtenção de transfectomas estáveis;
- ✓ Selecionar os clones com maior capacidade de produção da GBA a partir dos transfectomas estáveis;
- ✓ Analisar a atividade enzimática presente no sobrenadante dos clones selecionados;
- ✓ Avaliar comparativamente os resultados obtidos com o sistema de integração sítio-dirigida (pcDNA/5 FRT e células CHO Flp-In™) e com o sistema que promove integração aleatória (pcDNA3.1);
- ✓ Avaliar a influência da inserção da sequência de Kozak no primeiro ATG sobre a expressão da glucocerebrosidase.

III – METODOLOGIA

3.1 LINHAGENS CELULARES

CHO.K1

A linhagem celular CHO.K1 foi obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*). Ela é um sub-clone da linhagem parental CHO, que foi derivada a partir do ovário de um hamister chinês adulto. As células CHO.K1 precisam de prolina no meio de cultivo devido à ausência do gene da prolina sintetase.

CHO PRO⁻⁵

Como descrito anteriormente, a linhagem celular CHO PRO⁻⁵ foi selecionada por Raymond Baker, a partir da linhagem celular CHO.K1. Nela, o gene *β 4GalT-6*, que codifica a β -4-galactosil-transferase-6, não é expresso, o que faz com que a eficiência de adição de resíduos de ácido siálico aos *N*-glicanos produzidos por essas células seja baixa (Lee *et al.*, 2001). Esta linhagem foi gentilmente cedida pela Dra. Pamela Stanley, Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University – Nova York, e está sendo utilizada neste trabalho por ser a linhagem parental da linhagem celular CHO LEC 1.3, que é de grande interesse para a expressão da GBA.

CHO LEC 1.3

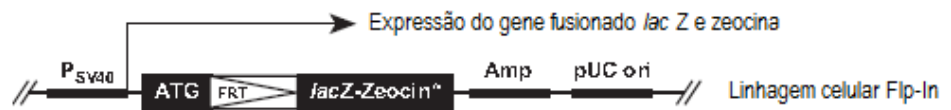
As células CHO LEC 1.3 foram isoladas a partir da linhagem CHO PRO⁻⁵ (Lee *et al.*, 2001) e gentilmente cedidas pela Dra. Pamela Stanley para uso neste trabalho. Estas células apresentam uma mutação no gene que codifica a enzima α -3-D-manosídeo β -1,2-*N*-acetil-glicosaminil-transferase I (GlcNAc-TI), tornando-a inativa. Sendo assim, essas células não são capazes de sintetizar *N*-glicanos do tipo complexo e nem híbrido, gerando estruturas oligomanosídicas simples, com diversas manoses expostas.

CHO Flp-InTM

A linhagem celular Flp-InTM CHO foi adquirida da empresa Invitrogen. Ela foi desenvolvida a partir da linhagem CHO.K1 e contém uma cópia do plasmídeo pFRT/*lacZeo2* integrada em seu genoma. Esse plasmídeo possui o sítio de FRT para a inserção específica do vetor de expressão pcDNA5/FRT pela ação da recombinase Flp, que é codificada pelo plasmídeo pOG44 (Figura 13). O plasmídeo pFRT/*lacZeo2* está localizado em uma região de transcrição ativa e, portanto, o gene que se integrar neste local deverá ter bons níveis de expressão, de acordo com o fabricante

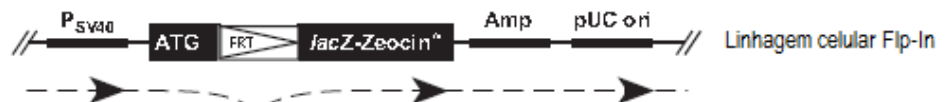
(Invitrogen Manuals, 2009a).

1- pFRT/lacZ é transfectado de forma estável nas células de mamífero de interesse para gerar a linhagem celular hospedeira Flp-In resistente à zeocina.

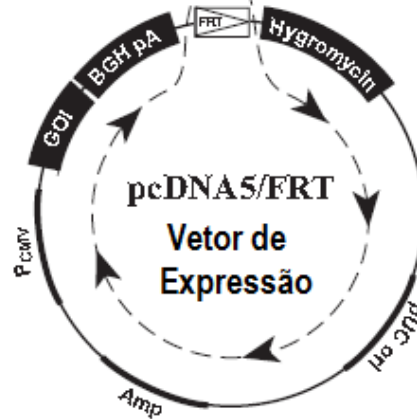


2- O vetor de expressão pcDNA5/FRT contendo o gene de interesse (GOI) é co-transfectado com o pOG44 na linhagem celular hospedeira Flp-In.

↓ + pOG44
+ pcDNA5/FRT



3- A recombinase Flp expressa a partir do pOG44 catalisa o evento de recombinação homóloga entre os sítios FRT da célula hospedeira e no vetor de expressão pcDNA5/FRT.



4- A integração da construção de expressão permite a transcrição do gene de interesse (GOI) e confere resistência à higromicina e sensibilidade à zeocina às células.

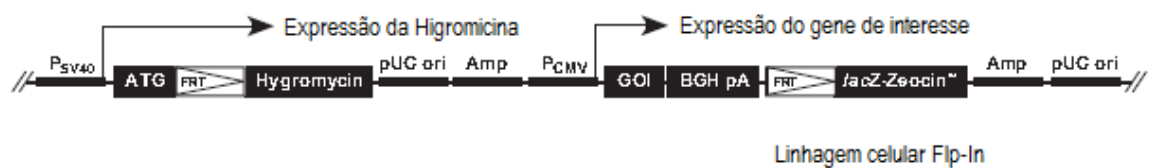


Figura 13: Representação da integração sítio-dirigida das células CHO Flp-InTM (Invitrogen Manuals, 2009a).

BACTÉRIAS

Nas etapas de construção de vetor foram utilizadas linhagens bacterianas de *E. coli* DH5- α obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*) para o preparo de bactérias quimicamente competentes.

3.2 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

3.2.1. CÉLULAS DE MAMÍFEROS

As células CHO foram mantidas em uma mistura 1:1 dos meios DMEM e Ham's F12, suplementados com 5% v/v de soro fetal bovino (SFB), todos adquiridos da empresa Cultilab, Campinas/SP, e incubadas em estufa úmida a 37 °C com 5% v/v de CO₂. Ao meio de cultivo das células transfectadas também foi adicionado antibiótico (geneticina – G-418 ou higromicina B, na concentração de 750 µg/mL), durante um período de dois meses, para a seleção das células nas quais houve integração estável do vetor recombinante conferindo resistência a esses antibióticos.

Após o estabelecimento de uma monocamada confluyente, as células foram desprendidas pela ação da tripsina. A suspensão celular foi quantificada e dividida (na concentração requerida em cada experimento) em novos frascos T (de 25 cm²) ou em placas (de 6, 24 ou 96 poços) e foi adicionado meio de cultivo completo (com suplementação de SFB) para a propagação celular. Os volumes de meio de cultivo utilizados foram de 5 mL para os frascos T e de 3mL, 1mL e 200µL para os poços das placas de 6, 24 e 96 poços, respectivamente.

3.2.2. CÉLULAS BACTERIANAS

As linhagens bacterianas foram propagadas em caldo de Lúria-Bertani (LB) e incubadas a 37 °C sob agitação constante de 190 - 200 rpm por um período de 12 - 18 horas. No caso de bactérias transformadas com plasmídeo, foi adicionado ao caldo o antibiótico ampicilina (100 µg/mL) ou kanamicina (50 µg/mL), dependendo da resistência que o respectivo plasmídeo confere. As linhagens bacterianas também foram propagadas em placas contendo ágar LB, sendo que, mais uma vez, no caso de bactérias transformadas, foi adicionado antibiótico. As placas foram incubadas em estufa úmida a 37 °C por um período de 16 – 18 horas.

3.3 CRIOPRESERVAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

3.3.1 CÉLULAS DE MAMÍFEROS

As células CHO não transfectadas e as culturas estavelmente transfectadas foram estocadas em tanque de nitrogênio líquido. Para preparar cada criostoque, células propagadas em frascos do tipo T foram desprendidas pela ação da tripsina, quantificadas, centrifugadas a 200 g por 3 minutos, ressuspendidas em meio de congelamento (80% v/v de SFB, 12,5% v/v de DMEM/Ham's F12 1:1 e 7,5% v/v de dimetil sulfoxido - DMSO) na concentração de 2-4x10⁶ células/mL e aliqüotadas em 1 mL por criotubo. Os criotubos foram mantidos a – 80 °C por aproximadamente 24 horas, em recipiente contendo isopropanol, para se obter uma velocidade de congelamento de

aproximadamente -1 °C/minuto, sendo depois transferidos para o criotanque (Léo *et al.*, 2008).

3.3.2 CÉLULAS BACTERIANAS

As culturas bacterianas foram estocadas em tanque de nitrogênio líquido a -80 °C. Após um repique por esgotamento em ágar LB (com ou sem antibiótico), colônias isoladas foram selecionadas e propagadas em LB líquido (com ou sem antibiótico). Foi adicionado 15% v/v de glicerol e 1 mL desta cultura foi guardada em criotubos para armazenamento em nitrogênio líquido ou a -80 °C.

3.4 DESCONGELAMENTO DAS LINHAGENS CELULARES

3.4.1 CÉLULAS DE MAMÍFEROS

O descongelamento das linhagens de células de mamíferos foi feito de maneira rápida, incubando os criotubos em um banho termostático a 37 °C durante 2 minutos. O conteúdo do criotubo foi ressuscitado no meio de cultivo (sem suplementação de SFB) e centrifugado a 200 g por 3 min, para que a lavagem retirasse o restante do meio de congelamento e os debris celulares. O sedimentado foi ressuscitado em 10 mL de meio de cultivo completo e uma alíquota foi retirada para determinação da concentração e viabilidade celular (Léo *et al.*, 2008). O restante do meio foi adicionado a um frasco T25 e incubado conforme descrito anteriormente.

3.4.2 CÉLULAS BACTERIANAS

As linhagens bacterianas foram descongeladas da seguinte maneira: o criotubo foi retirado do freezer a -80 °C ou do tanque de nitrogênio líquido e colocado em banho de gelo. Imediatamente, foi feito um raspado da cultura congelada com o auxílio de uma ponteira e esta foi mergulhada em 3-5 mL de caldo LB (com ou sem antibiótico). A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação, conforme descrito anteriormente.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a construção dos vetores de expressão, os fragmentos de interesse foram amplificados pela técnica de PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados neste trabalho para delimitar a seqüência amplificada foram desenhados com o auxílio do programa DNASTAR, utilizando como seqüência padrão seqüências depositadas no GeneBank (banco mundial de seqüências gênicas). A temperatura de fusão (TM) foi analisada no site <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>. Na extremidade 5' dos *primers*, foi adicionado sítio de reconhecimento de enzimas de restrição específicas de importância na etapa de

clonagem. A escolha das enzimas de restrição utilizadas foi feita mediante análise do mapa de restrição dos vetores comerciais (nos quais os fragmentos de interesse foram inseridos) e pela análise do mapa de restrição do inserto, realizadas por meio da utilização do site <http://tools.neb.com/NEBcutter2>. Os *primers* utilizados neste trabalho, assim como a empresa na qual os mesmos foram sintetizados, estão na Tabela 3.

Tabela 3: Informações sobre todos os *primers* utilizados nesse trabalho.

Nome	Seqüência (5'-3')	Propriedades	TM	Empresa
GBA_F	GCT AGC CAC <u>CAT</u> GGA GTT TTC AAG TCC TTC CAG AGA G	Sítio <i>NheI</i> (GCT AGC) Seqüência de Kozak (GCCACC)	57 °C	IDT
GBA_R	GAA TTC TCG AGT <u>TAT</u> CAC TGG CGA CGC CAC AG	Sítio <i>EcoRI</i> (GAATTC) Sítio <i>XhoI</i> (CTC GAG) Stop códon adicional	57 °C	IDT
Tempo real_F	GAAAGT GAA GGG ATT TGG AG	-	60 °C	IDT
Tempo real_R	ATA TCC GAT TCC TTC TTC AGA G	-	60 °C	IDT
β -actina_F	GCT GAC CGG ATG CAG AAG GAG AT	-	61 °C	IDT
β -actina_R	GGA GCC ACC GAT CCA CAC AGA G	-	61,8 °C	IDT
M13F	GTAAAA CGA CGG CCA G	-	50 °C	GeneLink
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	-	50 °C	GeneLink
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	-	50 °C	GeneLink
BGHR	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	-	50 °C	GeneLink

O DNA utilizado como molde na reação de PCR foi o cDNA da glucocerebrosidase comercializado pela empresa Origene (código SC120080, referência ID NM_000157, beta glicosidase de *Homo sapiens*, variante transcrita 1).

Para a amplificação do cDNA com a finalidade de clonagem, foi utilizada uma DNA polimerase de alta fidelidade, a Pfx50 (Invitrogen, #12335-012). A mistura reacional foi preparada conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Componentes da reação de PCR com o objetivo de amplificar o produto de interesse e seus volumes correspondentes.

Reação de PCR	
Tampão Pfx50 10X concentrado	5,0 μ L
Nucleotídeos dNTP (25mM)	0,5 μ L
GBA_F (25pmol/ μ L)	0,5 μ L
GBA_R (25 pmol/ μ L)	0,5 μ L
cDNA GBA (0,1 ng/ μ L)	1,0 μ L
Pfx 50 (5U/ μ L)	1,0 μ L
Água Milli Q	41,5 μ L

O microtubo contendo a mistura da reação de PCR (Tabela 4) foi colocado em um termociclador (Veriti®, Applied Biosystems) e submetido a 1 ciclo de 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos compostos, cada um, de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C e 90 segundos a 68°C, finalizando-se com 1 ciclo de 5 minutos a 68°C.

Quando o objetivo era apenas a amplificação para confirmar a presença do inserto ou a orientação do mesmo no vetor de clonagem, foi utilizada a enzima *Easy Taq* DNA polimerase (LGC Biotecnologia), em mistura reacional contendo os compostos especificados na Tabela 5.

Tabela 5: Componentes da reação de PCR com o objetivo de verificar a inserção do fragmento em determinado vetor e seus volumes correspondentes.

Reação de PCR	
Tampão da enzima 10X concentrado	2,0 µL
MgCl ₂ (50mM)	0,6 µL
Nucleotídeos dNTP (25mM)	0,2 µL
M13F ou T7 (25pmol/µL)	0,2 µL
M13R ou BGHR (25 pmol/µL)	0,2 µL
Taq (5U/µL)	1,0 µL
Água Milli Q	15,8 µL

Quando era realizado um PCR de colônia (reação de PCR que utiliza diretamente colônias bacterianas como molde para a amplificação), esta era retirada da placa e adicionada ao microtubo com o auxílio de uma ponteira. Já quando o molde a ser utilizado na reação de PCR era fruto de uma extração plasmidial, utilizava-se 1 µL de uma diluição 1:10 do produto da extração. Os microtubos contendo as misturas reacionais presentes na Tabela 5 foram colocados em um termociclador (Veriti®, Applied Biosystems) e submetidas a 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos compostos, cada um, de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C e 1 minuto e 45 segundos a 72°C, finalizando-se com 1 ciclo de 10 minutos a 72°C.

Os produtos gerados pela amplificação por PCR foram analisados imediatamente após o término da reação, ou após armazenamento à 4 °C por até 12 horas, através de eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) em tampão TBE 0,5X (tris(hidroximetil)aminometano 44,5 mM; ácido bórico 44,5 mM; EDTA 1 mM), corado com brometo de etídeo e observado sob luz ultravioleta.

3.6 CLONAGEM DO GENE DE INTERESSE

Os fragmentos de cDNA obtidos através da amplificação com a enzima de alta fidelidade por reação de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1% (m/v) e submetidos a uma eletroforese em tampão TBE 1X. Após a coloração do gel com brometo de etídeo e observação sob luz

ultravioleta, a banda contendo o produto de interesse foi cortada do gel e purificada com a utilização do kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Life Sciences), para a remoção da agarose.

Os fragmentos foram clonados no vetor de clonagem pCR2.1 (TA Cloning® Kit - Invitrogen). Para isso, foi necessária a adição de adenina às extremidades dos fragmentos amplificados, pois este vetor linearizado possui timidina em suas extremidades. Essa ligação está ilustrada na Figura 14. A adição de adenina foi feita através de uma reação de PCR com a enzima *Easy Taq* DNA polimerase, conduzida em 1 só ciclo de 15 minutos a 72 °C, em microtubo contendo a mistura reacional descrita na Tabela 6.

Tabela 6: Componentes da reação de adição da adenina às extremidades do produto de PCR.

Componentes da reação	
Tampão 10X concentrado	2,0 µL
MgCl ₂ (50mM)	0,6 µL
Nucleotídeos dNTP (25mM)	0,4 µL
Taq (5U/µL)	0,2 µL
DNA extraído do gel	16,8 µL

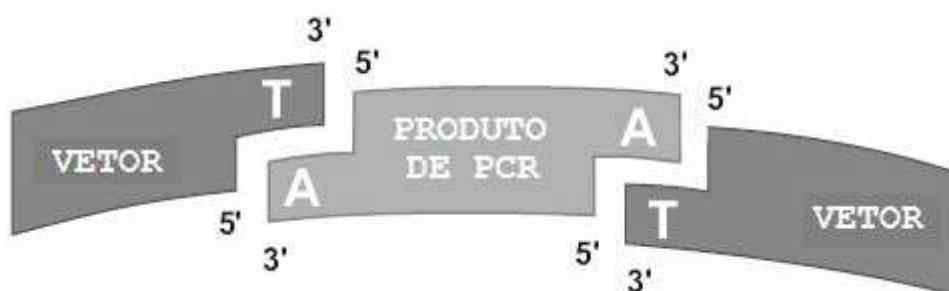


Figura 14: Representação da ligação do vetor pCR2.1 ao fragmento amplificado por PCR. A ligação entre a adenina, adicionada ao produto de PCR por ação da Taq polimerase, e a timidina, presente nas extremidades do vetor de clonagem, é realizada pela ação da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen Manuals, 2004).

A ligação entre o produto de PCR e o vetor de clonagem foi realizada por 16 horas a 14 °C utilizando-se a enzima T4 DNA ligase, presente no kit do vetor de clonagem, adotando-se a mistura reacional descrita na Tabela 7.

Tabela 7: Componentes da reação de ligação do produto de PCR ao vetor de clonagem.

Reação de ligação	
Tampão da ligase 5X concentrado	3,0 µL
Ligase (1U/µL)	4,0 µL
Vetor (pCR2.1 linearizado)	2,0 µL
DNA tratado com Taq	6,0 µL

Após a ligação do inserto ao vetor de clonagem, o vetor resultante foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5 α quimicamente competentes (ver item 3.7). As bactérias transformadas foram propagadas em placas LB que continham o antibiótico de seleção, no caso ampicilina ou kanamicina, e X-gal, durante um período de aproximadamente 16 horas em estufa a 37 °C.

Devido à presença do antibiótico no meio, somente as bactérias que incorporaram o vetor de clonagem e, portanto, o gene de resistência ao antibiótico, podiam crescer. O vetor pCR2.1 possui os genes de resistência aos antibióticos ampicilina e kanamicina, o promotor P, o gene da β -galactosidase (*lacZ*) e a origem de replicação em procariontos (pUC ori), responsável pela multiplicação do número de cópias do vetor, conforme ilustrado na Figura 15.

No vetor pCR2.1, o local de inserção do produto de PCR se encontra entre o promotor *lacZ α* e o gene da β -galactosidase (*lacZ*). Sendo assim, se o vetor se re-ligar, sem a presença do produto de PCR, o promotor *lacZ α* promoverá a expressão do gene da β -galactosidase. Na presença do substrato da β -galactosidase (X-gal), as colônias capazes de a β -galactosidase poderão clivá-lo, passando a apresentar coloração azul. Já as bactérias que incorporam o vetor contendo o produto de PCR que se inseriu entre o promotor e o gene, não expressam o gene da β -galactosidase, de modo que as colônias geradas apresentam coloração branca.

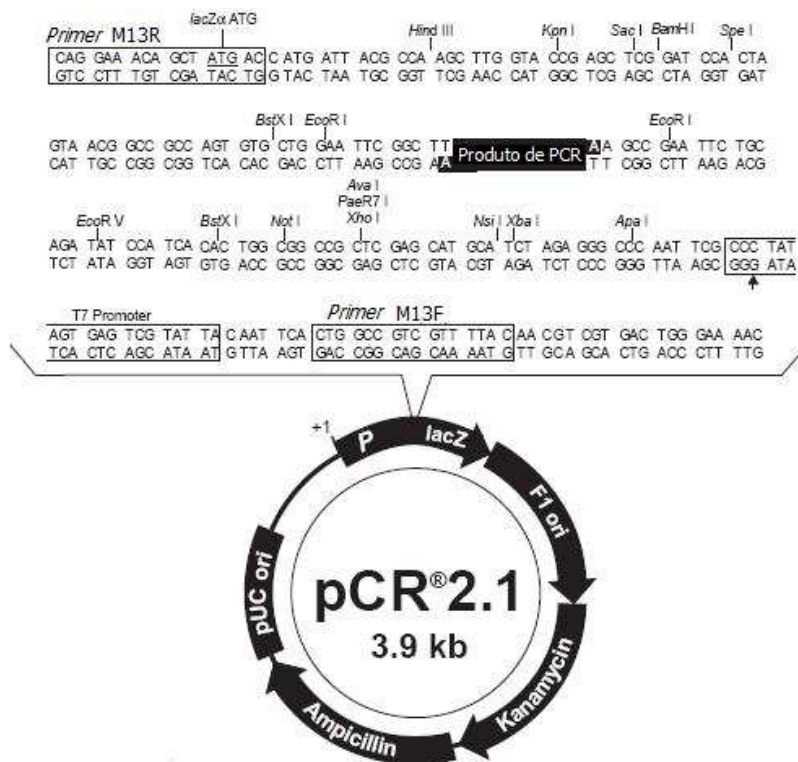


Figura 15: Representação do vetor de clonagem pCR2.1. Podem-se observar os genes de resistência a ampicilina e kanamicina, o promotor P, o gene *lacZ* e a origem de replicação em procariontos (pUC ori). No detalhe, observam-se os *primers* universais M13F e M13R, assim como os sítios das enzimas de restrição que flanqueiam a região de inserção do produto de PCR (Invitrogen Manuals, 2004).

Com base nisso, as colônias brancas obtidas foram submetidas a um novo *screening* por meio de PCR de colônia, para a verificação do fragmento inserido. Os *primers* utilizados no *screening* foram os *primers* que se ligam ao vetor (*primers* universais) M13F e M13R. A reação de PCR feita utilizando estes *primers* universais gera um produto amplificado em torno de 200 pb maior do que o tamanho real do inserto, pois eles se ligam em regiões do vetor que flanqueiam o local de inserção do produto de PCR.

Todos os vetores de clonagem obtidos durante o trabalho foram seqüenciados na empresa Macrogen (Coréia do Sul). As seqüências foram analisadas utilizando o programa DNASTAR com base nas seqüências depositadas no GeneBank, para a confirmação da ausência de mutações.

A construção do vetor de expressão foi feita mediante digestão do vetor de expressão (pcDNA3.1, Figura 16, ou pcDNA5/FRT, Figura 17, ambos da empresa Invitrogen) e do fragmento de interesse previamente clonado no vetor de clonagem, por enzimas de restrição específicas. As digestões foram realizadas utilizando duas enzimas que reconhecem os sítios de restrição que foram inseridos no par de *primers* ou que estão presentes no sítio múltiplo de clonagem do vetor de clonagem. Dessa forma, a utilização destas mesmas enzimas para digerir o sítio múltiplo de clonagem no vetor de expressão direcionou a ligação do inserto na orientação correta em relação ao promotor.

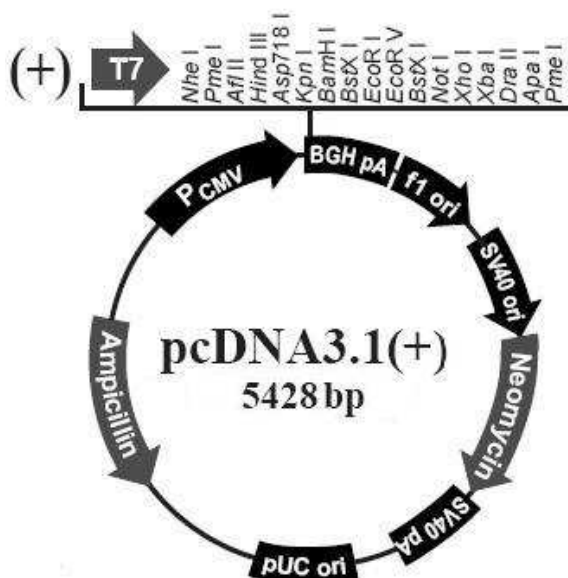


Figura 16: Representação do vetor pcDNA3.1. Em destaque observam-se o sítio múltiplo de clonagem (Invitrogen Manuals, 2009b).

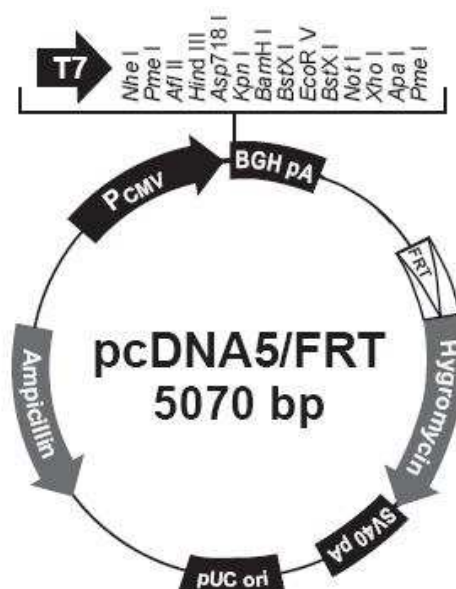


Figura 17: Representação do vetor pcDNA5/FRT. Em destaque observam-se o sítio múltiplo de clonagem (Invitrogen Manuals, 2009a).

Também foram realizadas algumas digestões com enzimas de restrição para verificar a presença dos sítios de restrição dos *primers* e para confirmar a presença e orientação do inserto. Nas digestões, o volume de reação utilizado foi de 10µL. As enzimas de restrição utilizadas neste trabalho foram compradas da empresa New England Biolabs. As digestões para clonagem foram realizadas por um período de 2 a 4 horas a 37°C e cada uma delas possuía 2µg de DNA, enquanto aquelas cujo objetivo foi apenas a análise de um determinado vetor tiveram duração de 2 a 16 horas, também a 37 °C, com 1µg de DNA. Os reagentes utilizados nas reações estão especificados na Tabela 8.

Tabela 8: Componentes da reação de digestão para clonagem e análise de vetores.

Reação de digestão
Tampão 10X concentrado compatível com as enzimas utilizadas
Enzimas de restrição – na concentração final de 1 U/µL
BSA 10X (quando necessário)

Os produtos das digestões foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X, corado com brometo de etídeo e observado sob luz ultravioleta. As bandas de interesse foram cortadas do gel e purificadas com a utilização de kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Life Sciences) para a remoção da agarose. Uma vez purificados, o fragmento de interesse e o vetor linearizado foram ligados pela ação da T4 DNA ligase (New England Biolabs), conforme instrução do fabricante, com uma proporção do inserto para o vetor de 4:1. O vetor resultante foi utilizado para transformar células de *E. coli* quimicamente competentes, para que a nova construção fosse amplificada.

Após a transformação, as colônias contendo os vetores foram selecionadas pelo crescimento em placas LB contendo antibiótico. Estas colônias foram submetidas a um *screening* por meio de PCR de colônia para a detecção das colônias contendo o vetor de interesse, conforme descrito anteriormente. Os *primers* utilizados neste *screening* foram os *primers* universais T7 e BGHR.

3.7 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

3.7.1 PREPARO DE BACTÉRIAS COMPETENTES

A linhagem de *E. coli* DH5- α foi tratada quimicamente, ou seja, com cloreto de cálcio (CaCl_2), para que elas se tornassem capazes de capturar DNA exógeno. O tratamento químico aumenta a permeabilidade celular, tornando-as competentes.

Uma colônia obtida de um crescimento em ágar LB foi escolhida e crescida em caldo LB conforme descrito anteriormente. Esta cultura foi utilizada como inóculo na diluição de 1:100 em 200 mL de caldo LB e esta nova cultura foi incubada a 37 °C sob agitação. A densidade ótica foi acompanhada por espectrofotometria e, ao atingir uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,3 – 0,5 (correspondente à fase de crescimento exponencial da cultura), as células foram incubadas em banho de gelo por 10 min. Decorrido este tempo, as células foram centrifugadas a 5000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado foi ressuscitado em 40 mL (1/5 do volume original) de MgCl_2 100 mM gelado. Novamente, as células foram submetidas a uma centrifugação a 5000 g por 5 minutos a 4 °C e o sedimentado, desta vez, foi ressuscitado em 2 mL (1/100 do volume original) de CaCl_2 100 mM gelado. Nas etapas em que as células foram ressuscitadas, não foi utilizada pipeta, pois as células se encontram muito frágeis neste momento e podem se romper facilmente. Ao final, as células foram estocadas em 20% v/v de glicerol, divididas em alíquotas de 50-100 μL e armazenadas a – 80 °C ou em nitrogênio líquido (Primrose & Twywan, 2006).

3.7.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA PELO MÉTODO DE CHOQUE TÉRMICO

Uma alíquota de 50-100 μL de bactérias competentes foi descongelada em banho de gelo e o vetor (ou produto de ligação) usado na transformação foi adicionado, incubando-se a mistura em banho de gelo por 30 minutos. O volume máximo utilizado do vetor (ou produto de ligação) foi de 10 μL . Posteriormente, foi dado um choque térmico a 42 °C por 1 minuto, seguido de banho de gelo por 2 minutos, para facilitar a captura do DNA exógeno pelas células competentes. Foram adicionados 500 μL de caldo LB e essa cultura foi incubada por 1 hora a 37 °C sob agitação, para que as bactérias fossem capazes de expressar o gene de resistência contido no plasmídeo recebido. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 5000 g por 5 minutos, o sedimentado foi ressuscitado em 100 μL de caldo LB e este foi espalhado em ágar LB contendo o antibiótico (ampicilina ou

kanamicina) para selecionar o crescimento das bactérias que incorporaram o vetor (Primrose & Twywan, 2006).

3.8 EXTRAÇÃO PLASMIDIAL

As colônias selecionadas após a transformação foram crescidas em caldo LB contendo ampicilina ou kanamicina. A extração plasmidial foi feita com a utilização dos kits comerciais *QIAprep Miniprep Kit* (QIAGEN) ou *PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen), conforme orientação do fabricante. A eluição foi feita em 100 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase. Os plasmídeos obtidos foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) em tampão TBE 1X, corado com brometo de etídeo e observado sob luz ultravioleta. A confirmação da identidade do plasmídeo foi feita por PCR ou mediante digestão enzimática com posterior corrida eletroforética para analisar o tamanho dos fragmentos.

3.9 TRANSFECCÃO DAS CÉLULAS DE MAMÍFEROS

3.9.1 TRANSFECCÃO ESTÁVEL

As células CHO foram transfectadas com os vetores de expressão construídos neste trabalho, utilizando o método de lipofecção, que utiliza lipídeos catiônicos. Esses lipídeos formam pequenos lipossomas unilamelares, cuja superfície se encontra carregada positivamente. Desta forma, ocorre uma ligação eletrostática com os grupos fosfato do DNA, formando complexos que, por sua vez, apresentam elevada afinidade pelas cargas negativas expostas na superfície das membranas celulares. A incorporação e liberação dos complexos lipídeo-DNA no meio intracelular é mediada por endocitose (Bollati-Fogolín & Comini, 2008).

Um dia antes da transfecção, as células foram repicadas para placas de 24 poços contendo 1 mL por poço de meio de cultivo completo, com inóculo de 10^5 células por poço, de forma que apresentassem cerca de 90% de confluência no momento da transfecção. Para cada poço com células, 2 µg de DNA total foram diluídos em 50 µL (volume final) de meio sem soro. No caso das células CHO Flp-In™, a proporção de vetor pcDNA5 (vetor de expressão) para o plasmídeo pOG44 (plasmídeo que codifica a recombinase Flp) foi de 1:9.

Em seguida, o lipídeo comercial Lipofectamine 2000 (Invitrogen), que apresenta uma concentração de 1µg/µL, foi diluído em 50 µL (volume final) de meio sem soro. A razão mássica utilizada de lipofectamina para DNA foi de 1:1, portanto foram utilizados 2 µL de lipofectamina por cada poço. A lipofectamina diluída foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, a lipofectamina diluída foi adicionada ao DNA diluído e essa mistura foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Por fim, os 100 µL desta mistura foram adicionados a cada

poço contendo as células a serem transfectadas. Não houve a necessidade de troca de meio, ou seja, a mistura foi adicionada ao meio de cultivo contendo SFB. A placa foi incubada a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas.

As células de cada poço foram repicadas para frasco T25 24 horas após a transfecção, adicionando-se antibiótico para selecionar as células transfectantes. A seleção da população estável foi feita com trocas de meio de cultivo contendo antibiótico a cada 5-7 dias, para a reposição do antibiótico e nutrientes presentes no meio. Decorridas cerca de 3-4 semanas na presença de antibiótico, a cultura controle (transfectada apenas com o lipídeo, sem o vetor) morreu por completo. Após atingirem a confluência, os cultivos foram repicados normalmente, sempre com adição de antibiótico. A pressão seletiva foi mantida por, pelo menos, 2 meses após a morte da cultura controle.

3.9.2 TRANSFEÇÃO TRANSIENTE

Para avaliação dos vetores e comparação de construções, foi analisada apenas a expressão transiente da GBA por células transfectadas. As células foram repicadas para placas de 6 poços contendo 3mL de meio de cultivo completo por poço, com inóculo de 10⁶ células por poço, de forma que atingissem cerca de 90% de confluência no dia seguinte. Para cada poço, 4 µg de DNA total foram diluídos em 50 µL (volume final) de meio sem soro.

Em seguida, o lipídeo comercial Lipofectamine 2000 (Invitrogen) foi diluído em 50 µL (volume final) de meio sem soro. A razão mássica utilizada de lipofectamina para DNA foi de 1:1, portanto foram utilizados 4 µL de lipofectamina por cada poço. A lipofectamina diluída foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, a lipofectamina diluída foi adicionada ao DNA diluído e essa mistura foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Por fim, os 100 µL desta mistura foram adicionados a cada poço contendo as células a serem transfectadas.

Não houve a necessidade de troca de meio, ou seja, a mistura foi adicionada ao meio de cultivo contendo SFB. A placa foi incubada a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, foi realizada a troca do meio de cultivo para a retirada da lipofectamina, que é tóxica para as células, e do DNA residual não incorporado pelas células. A cultura foi mantida por mais 48 horas, momento em que o meio e as células foram recolhidos para análise.

3.10 SELEÇÃO DE CLONES

A seleção de clones foi realizada pelo método de diluição limite. As linhagens celulares transfectadas de maneira estável foram submetidas à seleção de clones depois de serem mantidas sob pressão seletiva com antibiótico por dois meses. As células foram desprendidas por ação da tripsina e quantificadas pelo método do azul de trypan (item 3.11.1). Foram preparadas três

suspensões de cada transfectoma em 20mL de meio DMEM e Ham's F12 com suplementação de 10% de soro fetal bovino, nas concentrações de 2,5, 5 e 10 células/mL.

Cada solução foi utilizada para preencher uma placa de 96 poços, com volume final de 200µL por poço, de maneira a se obter uma concentração final média de 0,5, 1 e 2 células por poço, conforme mostrado na Tabela 9.

Tabela 9: Concentração das soluções utilizadas nas placas para diluição limite e concentração final.

Placas	Concentração em 20 mL	Diluição final (200µL)
Placa 1	10,0 células/mL	2,0 célula/poço
Placa 2	5,0 células/mL	1,0 célula/poço
Placa 3	2,5 células/mL	0,5 células/poço

Essas placas foram incubadas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ por 72 horas. A partir desse tempo, as placas foram observadas a cada 48 horas ao microscópio para acompanhamento do crescimento celular. Os poços nos quais havia apenas uma célula, que deu origem a apenas uma colônia, foram selecionados. Aqueles nos quais havia inicialmente duas ou mais células, gerando diversas colônias, foram eliminados.

Após atingir a confluência, os clones foram desprendidos pela ação da tripsina e foram expandidos em placas de 24 e 6 poços e frascos T25 com meio DMEM e HAM'S F12 com suplementação de 5% de soro fetal bovino, e incubados a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Após a obtenção de um número adequado de células os clones foram inoculados na concentração necessária para cada experimento e, também foram congelados.

3.11 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.11.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS

No presente trabalho, a concentração de células viáveis foi determinada através do método de exclusão com azul de trypan, no qual o corante consegue penetrar nas células mortas devido à não integridade da membrana plasmática, fazendo com que estas apresentem coloração azul (Strober, 2001). A contagem foi realizada ao microscópio óptico em câmara de Neubauer, utilizando a diluição adequada de acordo com a concentração celular da amostra.

3.11.2. DETECÇÃO EM MEMBRANA DA GLUCOCEREBROSIDASE

A seleção dos clones mais produtores de β-glucocerebrosidase foi realizada por *imuno-blot*, para a detecção da proteína no sobrenadante utilizando-se um anticorpo específico anti-GBA. Sendo

assim, quanto mais GBA estiver presente no sobrenadante, mais intensa será a coloração da banda visualizada. Os clones previamente selecionados pelo método de diluição limite, quando atingiram a confluência, foram desprendidos pela ação da tripsina e inoculados em placas de 24 poços. Quando uma nova monocamada foi formada, amostras dos sobrenadantes destes clones foram recolhidas para a realização desta análise.

O método consiste em adsorver as proteínas presentes na amostra a uma membrana (Immobilon™-P Transfer Membrane, Millipore), filtrando a amostra pela aplicação de vácuo, utilizando o sistema de *slot blot* (Bio-Dot® SF, da Bio-Rad), que delimita a área de retenção das amostras a pequenos poços (*slots*). O protocolo detalhado desta técnica se encontra no Anexo I.1.

Ao final do processo de revelação das membranas, estas foram digitalizadas e, algumas das imagens obtidas, analisadas pela medida da densitometria das bandas presentes nas membranas com o auxílio do programa ImageQuant5.2.

Dado que o aparelho possui 48 *slots*, em cada membrana, foram aplicados sobrenadantes de 24 clones em duplicata. Os melhores de cada membrana foram analisados conjuntamente em uma mesma membrana e os melhores desta última foram, então, selecionados como os clones com maior produção de β -glucocerebrosidase.

3.11.3 LISE CELULAR PARA ANÁLISE DE GBA INTRACELULAR

Os clones isolados foram inoculados em placas de 6 poços, a uma concentração de 10^5 células por poço. Quando atingiram a confluência, os sobrenadantes foram retirados para análises de atividade e precipitação de proteínas. As células foram desprendidas pela ação da tripsina e colocadas em microtubos. Após centrifugação, o *pellet* celular foi lavado duas vezes com PBS e ressuspenso em 1mL de PBS. Essa suspensão foi submetida a cinco ciclos de congelamento a -80 °C e posterior descongelamento, para que as células fossem lisadas.

3.11.4 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas presentes nos sobrenadantes das culturas e no lisado coletados conforme o item 3.11.3, foram precipitadas para posterior realização de ensaio de eletroforese SDS-PAGE. Para cada 1 mL de amostra, foram adicionados 100 μ L de solução composta por 15mg de deoxicolato de sódio, avolumada com água destilada para 100mL. Essa mistura foi agitada em vortex por 1 minuto e depois foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. Decorrido este período, foram adicionados 100 μ L de solução composta por 72g de ácido trifluoro acético, avolumada com água destilada para 100mL para cada 1mL de amostra e foi realizada uma centrifugação a 10.000g por 15 minutos. O *pellet* obtido foi lavado com 1mL de acetona. Foi realizada uma nova centrifugação a 10.000g por 5 minutos e o *pellet* foi ressuspenso em 20 μ L de água.

3.11.5 SDS-PAGE E WESTERN-BLOT

Foram realizados ensaios de eletroforese (SDS-PAGE) e *Western-blot* com o objetivo de analisar a massa molar e o padrão de bandas obtido na expressão da β -glucocerebrosidase recombinante pelas diferentes linhagens celulares.

A primeira etapa consiste na separação eletroforética dos componentes da amostra, utilizando o equipamento Mini-Protean III acoplado à fonte PowerPac HC (Bio-Rad), em um gel de poliacrilamida na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). Este gel foi preparado em duas etapas, como descrito na Tabela 10.

Tabela 10: Composição das soluções utilizadas no preparo do gel de SDS-PAGE.

10 mL do gel de resolução (10%)		10 mL do gel de empilhamento (4%)	
Água Milli Q -----	4,0mL	Água Milli Q -----	6,1mL
Tris 1,5M pH 8,8 -----	2,5mL	Tris 0,5M pH 6,8 -----	2,5mL
Acrilamida/bisacrilamida 30% -	3,3mL	Acrilamida/bisacrilamida 30% --	1,3mL
SDS 10% -----	100 μ L	SDS 10% -----	100 μ L
APS 10% -----	100 μ L	APS 10% -----	50 μ L
TEMED -----	10 μ L	TEMED -----	10 μ L

As amostras de 20 μ L oriundas da etapa de precipitação foram diluídas com 20 μ L de tampão de amostra (Tabela 11) e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Em seguida, 10 μ L de cada amostra foram aplicados no gel de eletroforese, o qual foi imerso em tampão de eletroforese (Tabela 11) e submetido a uma corrida com amperagem constante de 0,04A, por aproximadamente 1 hora.

Tabela 11: Composição do tampão de amostra e do tampão de eletroforese utilizados nos ensaios de SDS-PAGE.

Tampão de amostra:		Tampão de Eletroforese:	
Água Milli Q -----	3,55mL	Tris -----	3,0g
Tris 0,5M pH 6,8 -----	1,25mL	Glicina -----	14,4g
Glicerol -----	2,5mL	SDS -----	1,0g
SDS 10% -----	2,0mL	Água Milli Q -----	qsp 1000mL
Azul de bromofenol 0,5% -----	0,2mL		
Adicionar 50 μ L de β -mercaptoetanol a 950 μ L de tampão da amostra na hora de usar.			

Após esta etapa, alguns géis foram corados com prata (ver Anexo I.2) e outros transferidos para uma membrana (Immobilon™-P Transfer Membrane, Millipore) de acordo com o protocolo descrito no Anexo I.3, para realização de ensaios de *Western-blot*.

3.11.6 TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A β -glucocerebrosidase é a enzima que catalisa a quebra de glucocerebrosídeos em ceramida e glucose. Sua atividade enzimática *in vitro* é medida através da clivagem de um substrato específico, no caso o 4-metilumbeliferol β -D-glucopiranosídeo (4-MUD). A clivagem desse composto leva à liberação de 4-metilumbeliferona (4-MU), que é um composto fluorescente.

Através das comparações entre as metodologias classicamente utilizadas para a determinação da atividade da GBA a partir do trabalho realizado por Daniels e Glew (1982), o ensaio denominado pH 5,5/taurocolato foi considerado o mais adequado para as amostras dos sobrenadantes dos clones.

O taurocolato de sódio, um sal biliar, é empregado no tampão de reação, pois este composto é necessário para a atividade *in vitro* da β -glucocerebrosidase e, além disso, é capaz de inibir a ação das β -glucosidases, porém não inibe a ação da β -glucocerebrosidase ácida, que é a atividade de interesse nesse trabalho.

Os clones foram inoculados em placas de 6 poços, em duplicata, a uma concentração de 10^5 células por poço. Quando atingiram a confluência, os sobrenadantes foram retirados e armazenados em freezer $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para posterior análise da atividade. Todos os testes de atividades foram realizados no mesmo dia, com as mesmas soluções e foram analisados no mesmo aparelho.

Foram aplicados 48 μ L do tampão de reação com substrato (Tabela 12) e 36 μ L do sobrenadante das culturas em cada poço de microplaca preta (Corning/Costar, # 3915). As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C , por 4 horas.

Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 216 μ L de uma solução de parada (Tabela 12). Em cada placa, foi realizada uma curva padrão em triplicata, preparada com diferentes diluições de 4-metilumbeliferona (Sigma, #M1381) na solução de parada.

A leitura das placas foi realizada no equipamento Victor III (PerkinElmer) com filtro de excitação de 355nm e filtro de emissão de 460nm, por 0,1 segundos.

Tabela 12: Composição das soluções utilizadas nas dosagens de atividade de GBA.

Tampão de reação	Tampão acetato de sódio pH 5,5; Triton 100X (Sigma, # T8787); Taurocolato de sódio 0,125% (Sigma, BioChemika, #86336); Substrato (adicionado somente na hora do teste): 4-metilumbeliferol β -D-glucopiranosídeo 3mM (Sigma, #M3633);
Solução de parada	NaOH 0,1M Glicina 0,1M

Apesar de a atividade enzimática ser usualmente expressa em unidades internacionais (U.I.), sendo 1 UI correspondente a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de produto por minuto, nas condições reacionais estabelecidas, a maioria dos trabalhos científicos relacionados à produção e análise da glucocerebrosidase recombinante expressa os seus resultados em μ mol/h/mL. Dentro dessa perspectiva, os ensaios de atividade realizados neste trabalho tiveram os seus resultados expressos em μ mol/h/mL e foi calculada utilizando a equação:

$$\text{Atividade} = \frac{\mu\text{mol de 4-UM liberada} / 4 \text{ horas}}{0,036 \text{ mL do sobrenadante}}$$

Cada sobrenadante foi analisado em triplicata e para um mesmo clone, dois cultivos diferentes foram realizados. O desvio padrão entre os resultados das duas triplicatas analisadas está expresso, nos gráficos de atividade da glucocerebrosidase, pelas barras de erro.

3.11.7 PCR EM TEMPO REAL

A técnica de PCR em tempo real (ou PCR quantitativo) é muito sensível, permitindo a quantificação de determinado RNAm em uma célula e possibilitando, portanto, a quantificação de pequenas alterações no perfil de expressão de determinado gene.

Para a sua realização, os clones foram semeados em frascos T25 ou placas de 6 poços e mantidos em cultivo até que as células atingissem a confluência. Quando isso ocorreu, as células foram desprendidas pela ação da tripsina. Após a inativação da tripsina com soro fetal bovino, as células foram lavadas duas vezes com PBS, para retirar o meio residual, e o *pellet* celular foi armazenado em *freezer* a -80 °C.

A extração de RNAm das células foi realizada com o kit comercial RNeasy Mini Kit

(QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. Com a utilização do Kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems), foram sintetizados cDNAs a partir de 4µg de cada amostra de RNAm obtida, conforme a mistura reacional descrita na Tabela 13.

Tabela 13: Mistura reacional para a síntese de cDNA a partir de amostras de RNAm.

Síntese de cDNA	
Tampão 10X concentrado	5,0 µL
MgCl ₂ (25mM)	2,2 µL
dNTPs	2,0 µL
Oligo dt	0,5 µL
RNase inhibitor	0,2 µL
Reverse transcriptase	1,0 µL
RNA (4µg)	-
Água Milli Q	qsp 10 µL

O microtubo contendo a mistura reacional descrita na Tabela 13 foi colocado em um termociclador (Veriti®, Applied Biosystems) e mantido por 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 48 °C e 5 minutos a 55 °C.

O PCR em tempo real é uma técnica simples e de fácil realização, que permite a quantificação de RNAm de maneira precisa. Essa quantificação é relativa, ou seja, é baseada na expressão relativa do gene alvo com relação à expressão de um gene de referência. Para isso, é necessária a normalização do gene alvo em relação a um gene endógeno não regulado como, por exemplo, a actina, cuja expressão é necessária para a sobrevivência da célula. Desta maneira, todas as amostras de RNA extraídas são submetidas a duas reações em duplicata, uma contendo os *primers* do gene de interesse e outra contendo os *primers* do gene endógeno.

Todos os *primers* utilizados para as análises de PCR em tempo real foram desenhados de maneira a se anelarem às extremidades de dois éxons consecutivos. Sendo assim, se as amostras de RNA extraídas das células possuírem contaminantes de DNA genômico, o tamanho do fragmento amplificado será diferente do esperado. Para este trabalho, foram desenhados dois *primers* para o gene endógeno β-actina de células CHO (β-actina_F e β-actina_R), cujo produto de amplificação gerado deve possuir 105pb, e um par de *primers* da glucocerebrosidase (TRGBA_F e TRGBA_R), cujo produto de amplificação gerado deve apresentar 121pb.

No PCR em tempo real, existem dois métodos de quantificação, um que utiliza sondas específicas e outro método não-específico. Os sistemas específicos, como o TaqMan (Applied Biosystems), se baseiam em sondas altamente específicas que se ligam à sequência alvo, emitindo fluorescência apenas na presença do produto de PCR de interesse.

No presente trabalho, utilizou-se o método não específico, baseado em Sybr Green (Applied

Biosystems), um reagente capaz de se ligar a qualquer fragmento de fita dupla de DNA e emitir fluorescência. Dessa maneira, o sinal de fluorescência aumenta a cada ciclo da reação. Este método é inespecífico e pode levar à amplificação de outros produtos que não o fragmento de interesse. A fim de se verificar a ocorrência dessas amplificações inespecíficas, utiliza-se um recurso denominado curva de dissociação, que determina a temperatura de fusão dos produtos de PCR obtidos ao final da reação.

Assim, ao final da reação de PCR, o equipamento é programado para realizar a curva de dissociação. Primeiramente, os produtos de reação são aquecidos a 95°C e resfriados a 60 °C. Neste ponto, todos os produtos de PCR devem estar na forma de fita dupla de DNA, às quais o Sybr Green se liga, emitindo fluorescência. A partir deste ponto, é realizado um lento aquecimento. Quando é detectada uma queda na fluorescência emitida pelo Sybr Green, isto significa que a dupla fita terá se desnaturado, ou seja, a temperatura de fusão daquele produto específico terá sido alcançada. Se a reação tiver sido bem específica, todos os produtos de PCR serão desnaturados na mesma temperatura, gerando um gráfico com apenas um pico. Já se ocorrer a amplificação de diferentes fragmentos ou a dimerização dos *primers*, outros picos serão observados na curva de dissociação.

A mistura reacional nas análises de PCR em tempo real foi preparada de acordo com a Tabela 14.

Tabela 14: Mistura reacional para as análises de PCR em tempo real.

PCR em tempo real	
Mix Sybr green	7,5 μL
TRGBA_F ou Actina_F (10mM)	0,75 μL
TRGBA_R ou Actina_R (10mM)	0,75 μL
cDNA	3,0 μL
Água Milli Q	3,0 μL

A mistura reacional descrita na Tabela 14 foi colocada nos poços de placas de 96 poços. Estas placas foram colocadas no aparelho StepOne Real-time PCR Systems (Applied Biosystems) e submetidas ao programa descrito na Tabela 15.

Tabela 15: Programa das análises de PCR em tempo real no termociclador.

Programa da reação de PCR em tempo real		
Dissociação inicial	1 ciclo	10 minutos a 95°C
Amplificação	40 ciclos	15 segundos a 95 °C 60 segundos a 60 °C 30 segundos a 72 °C
Curva de dissociação	1 ciclo	15 segundos a 95 °C 60 segundos a 60 °C 15 segundos a 95 °C

O método matemático utilizado para a análise dos resultados nesse trabalho foi o sugerido por Pfaffl (2001), segundo o qual é necessária primeiramente a determinação da eficiência dos *primers* utilizados na reação de PCR. Para isso, realiza-se uma reação de PCR com diferentes diluições de um cDNA, a fim de se determinar com quantos ciclos o “*threshold*”, isto é, o nível estabelecido como *background*, será ultrapassado. Este número de ciclos recebe o nome de Ct.

Com base nos resultados obtidos pode-se montar um gráfico, do log da concentração de cDNA *versus* o Ct, e calcular o coeficiente angular da reta obtida. A eficiência (E) é calculada de acordo com a equação (1). A expressão relativa do gene alvo (R) é calculada levando-se em consideração a eficiência e o Ct de uma amostra desconhecida *versus* o seu controle, e expressa em comparação com o gene de referência, conforme a equação (2) abaixo.

$$E = 10^{(-1/\text{coef angular})} \quad (1)$$

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{Ct do alvo (controle - amostra)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct da referência (controle - amostra)}}} \quad (2)$$

Quando a eficiência da reação é de 100%, o número de cópias de DNA que será gerada ao final de 35 ciclos vai ser de 2^{35} . Já se a eficiência da reação for de 90%, ao final de 35 ciclos de reação obtem-se $1,9^{35}$ cópias do DNA e assim por diante. Os cálculos realizados para as análises de PCR em tempo real deste trabalho estão demonstrados na Tabela 16. No caso, a eficiência dos *primers* da GBA foi de 73%, e ao final dos 35 ciclos de reação espera-se obter $1,73^{35}$ cópias do DNA inicial. Já com os *primers* da actina, que apresentam eficiência de 56%, o número de cópias esperada ao final dos 35 ciclos é de $1,56^{35}$ cópias do DNA inicial.

Tabela 16: Demonstração dos cálculos utilizados para a análise dos ensaios de PCR em tempo real.

	Ct GBA (eficiência de 73%)	Ct Actina (eficiência de 56%)	Expressão relativa ao controle
Célula controle			
Reação 1	35,21	23,43	
Reação 2	35,33	23,36	
Média	35,27	23,39	
	$1,73^{(35,27-35,27)} = 1$	$1,56^{(23,39-23,39)} = 1$	$1/1 = 1$
Clone A			
Reação 1	18,13	16,73	
Reação 2	18,07	16,78	
Média	18,10	16,75	
	$1,73^{(35,27 - 18,10)} =$ 12.225,08	$1,56^{(23,39 - 16,75)} =$ 19,16	$12.225,08 / 19,16 =$ 638,05

IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CLONAGEM DO GENE DA GBA NOS VETORES DE EXPRESSÃO

O cDNA da β -glucocerebrosidase foi obtido por reação de PCR, utilizando como sequência molde o cDNA obtido da empresa Origene (código SC120080, referência ID NM_000157, beta glucosidase de *Homo sapiens*, variante transcrita 1). Essa sequência foi amplificada utilizando os *primers* GBA_F e GBA_R, gerando um produto de 1,6 kb. A fim de verificar a temperatura ideal de anelamento dos *primers*, foi realizado um PCR teste, utilizando temperaturas de 54 a 59°C (Figura 18A). O cDNA da GBA foi corretamente amplificado e a mesma intensidade foi obtida em todas as temperaturas testadas. A temperatura de 57 °C foi escolhida por ser uma temperatura média entre os extremos testados. A partir dessa escolha, foi realizada uma nova reação de PCR, cujo produto obtido foi clonado no vetor de clonagem pCR2.1 (Figura 18B).

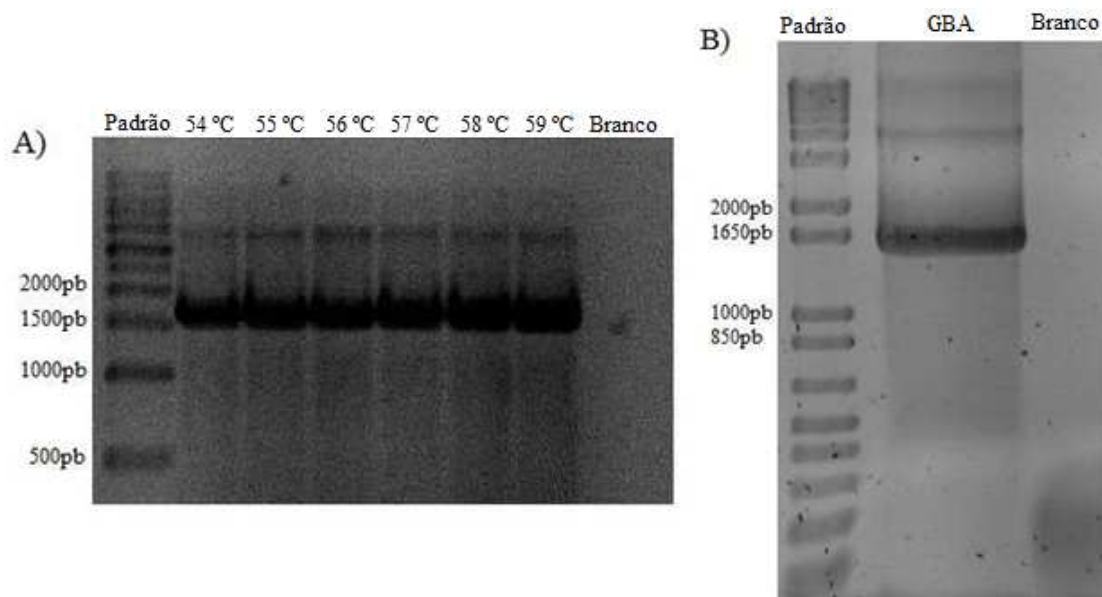


Figura 18: Amplificação do cDNA da GBA. A) Teste de temperatura de anelamento dos *primers* GBA_F e GBA_R. Padrão de tamanho de fragmento 1kb (LGC Biotecnologia). B) Amplificação do cDNA da GBA para clonagem no vetor pCR2.1. Padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen).

O produto de ligação do fragmento amplificado ao vetor pCR2.1 foi usado para a transformação de bactérias competentes. As bactérias resistentes ao antibiótico kanamicina que apresentaram coloração branca foram analisadas por PCR de colônia, utilizando os *primers* M13F e M13R (Figura 19).

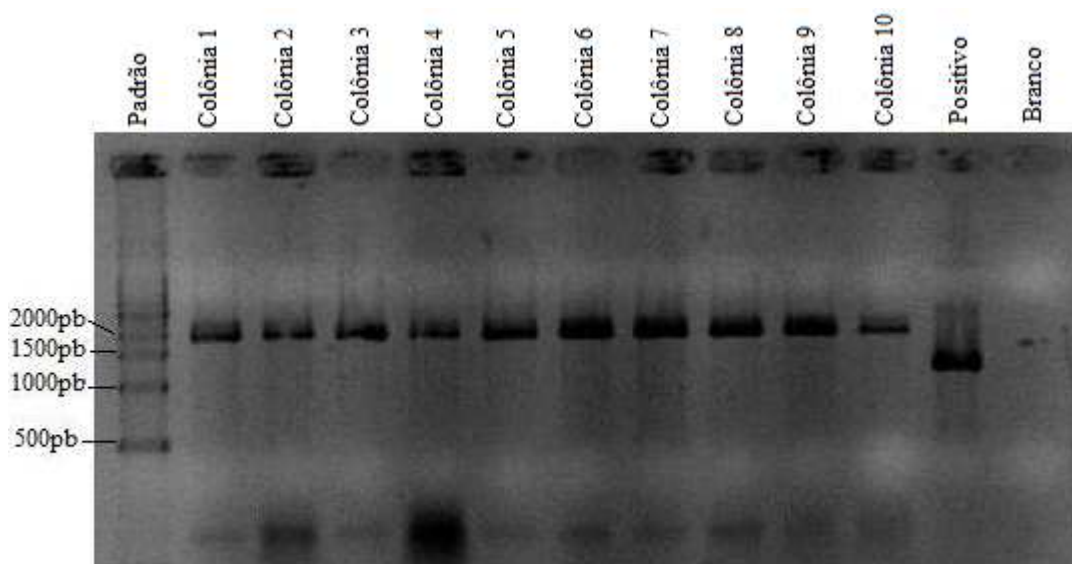


Figura 19: PCR de colônia para detectar colônias que continham o vetor pCR2.1 com o inserto da GBA usando os *primers* M13F e M13R. Padrão de tamanho de fragmento 1kb (LGC Biotecnologia) e colônias obtidas pela transformação com o produto de ligação do vetor pCR2.1 ao cDNA amplificado da GBA.

Todas as colônias analisadas possuíam o inserto. Os fragmentos amplificados possuíam um tamanho de aproximadamente 1,8 kb, cerca de 200 pb maior do que o cDNA da GBA. Isto se deve ao fato de que os *primers* utilizados (M13F e M13R) se ligam a sítios do vetor de clonagem, externos ao inserto.

As colônias 5, 6, 7, 8 e 9 foram propagadas em meio seletivo e foi realizada a extração plasmidial dos caldos obtidos. Os plasmídeos foram analisados, por dupla digestão, com as enzimas de restrição *NheI* e *XhoI*, que reconheciam os sítios presentes nos *primers* GBA_F e GBA_R, respectivamente (Figura 20).

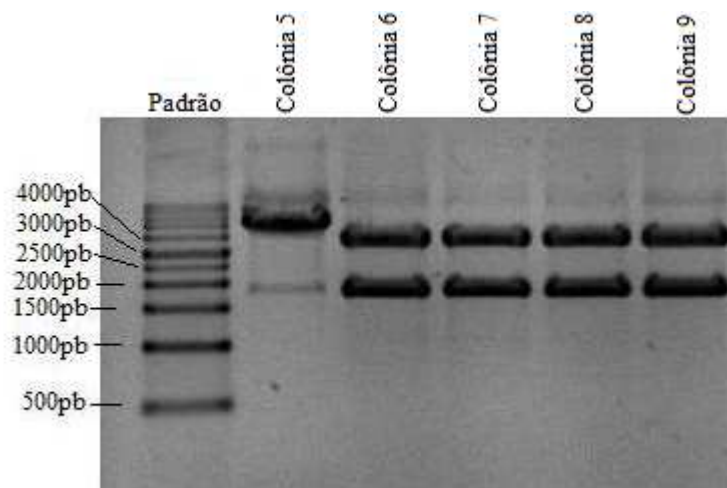


Foto 20: Digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição *NheI* e *XhoI*. Padrão de tamanho de fragmento 1kb (LGC Biotecnologia).

As colônias 6, 7, 8 e 9 (raias 3 a 6) foram corretamente digeridas, liberando o inserto (GBA) com aproximadamente 1,6kb do vetor de clonagem, com aproximadamente 3,9kb, o que indica que

os sítios de restrição dos *primers* que se incorporaram a esses vetores devem estar corretos nessas colônias. Já a digestão da colônia 5 não levou a liberação do inserto, provavelmente, por alguma alteração das sequências de restrição presentes. Para dar prosseguimento ao trabalho, as colônias 6, 7, 8 e 9 foram enviadas para sequenciamento.

Apesar da amplificação do cDNA da GBA ter sido realizada por uma enzima DNA polimerase de alta fidelidade, as análises do sequenciamento mostraram mutações pontuais nas sequências obtidas para as colônias 6, 7 e 9. O sequenciamento da colônia 8 estava correto, no entanto o sítio da enzima de restrição *NheI* do *primer* GBA_F e a sequência de Kozak, que precede o ATG, estavam alterados.

Como o sítio da enzima de restrição *NheI* não se encontra presente no sítio múltiplo de clonagem do vetor de clonagem, na colônia 8 a dupla digestão, provavelmente, foi realizada nos sítios da enzima de restrição *XhoI* presentes tanto no vetor de clonagem quanto no *primer* GBA_R, cuja sequência estava correta. É importante observar que, a partir do fragmento obtido pela digestão com a enzima *XhoI*, pode-se saber em que orientação o inserto se ligou ao vetor pCR2.1. Como o resultado da digestão foi aproximadamente do tamanho da GBA, os sítios de *XhoI* não poderiam estar próximos, mas sim em extremidades opostas do fragmento, como pode ser visualizado na Figura 21.

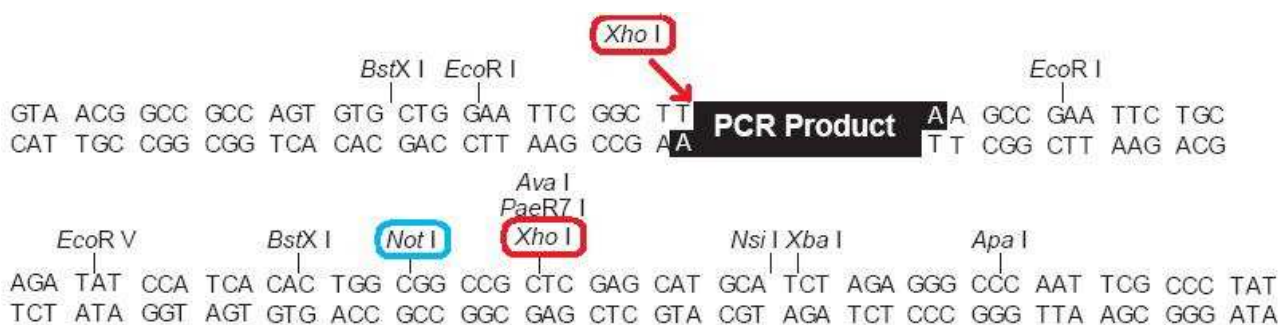


Figura 21: Visão detalhada do polylinker do pCR2.1. Em vermelho estão destacados os sítios da enzima de restrição *XhoI*, no vetor de clonagem e no *primer* reverso. Em azul está destacado o sítio de restrição da enzima *NotI*, presente no vetor de clonagem, que poderá ser utilizado nas próximas etapas de clonagem (Figura adaptada de Invitrogen Manuals, 2004).

Como a sequência do cDNA da GBA não apresenta nenhum sítio da enzima de restrição *NotI*, que está presente tanto no vetor de clonagem quanto nos vetores de expressão, esta pôde ser utilizada para a clonagem do insertos nos vetores pcDNA3.1 e pcDNA5/FRT, juntamente com a enzima de restrição *XhoI*, presente no *primer* GBA_R. A Figura 22 mostra a digestão dos vetores de expressão e do pCR2.1, liberando o inserto (GBA).

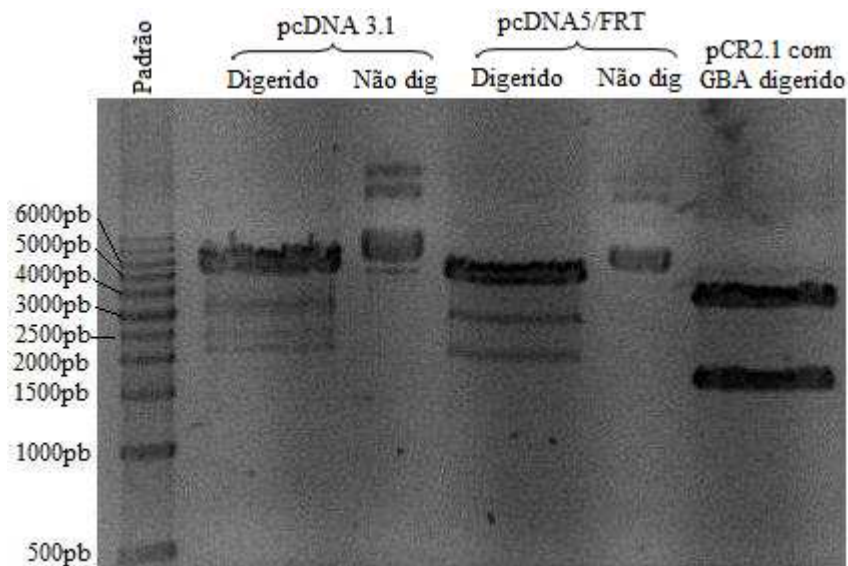


Figura 22: Dupla digestão dos vetores pCR2.1 (contendo o gene da GBA), pcDNA3.1 e pDNA5/FRT com as enzimas de restrição *NotI* e *XhoI*. Padrão de tamanho de fragmento 1kb (LGC Biotecnologia).

O produto de ligação do fragmento retirado do pCR2.1 aos vetores de expressão foi utilizado para a transformação de bactérias competentes. As bactérias resistentes à ampicilina foram analisadas por PCR de colônia, utilizando os *primers* T7 e BGHR, que se ligam a sítios externos ao inserto no vetor de expressão (Figura 23). Devido às diferenças presentes no sítio múltiplo de clonagem dos dois vetores de expressão utilizados no trabalho, os fragmentos amplificados nas duas reações de PCR devem apresentar tamanhos diferentes.

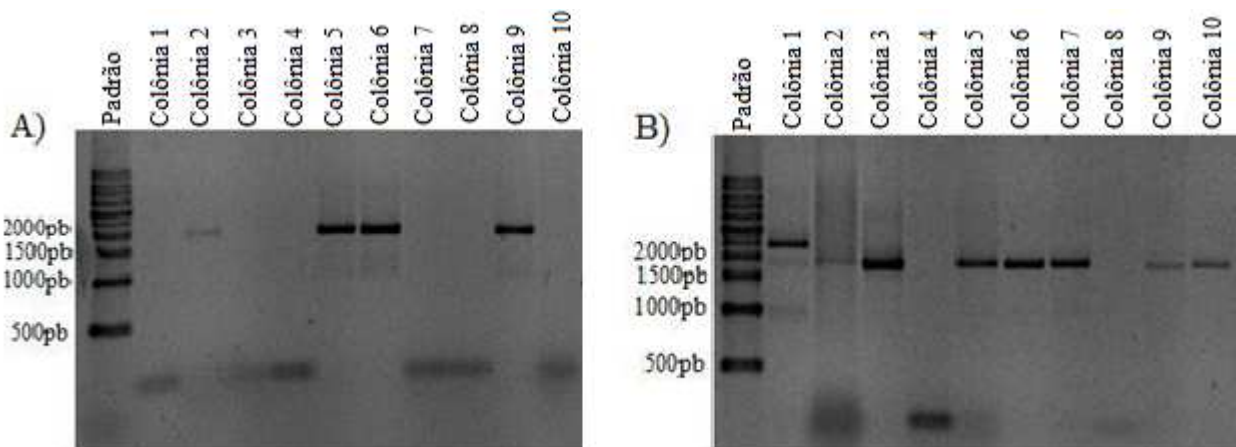


Figura 23: PCR de colônia para verificação do inserto. A) Colônias obtidas pela ligação do vetor pcDNA3.1 com a GBA. Padrão de tamanho de fragmento 1kb (LGC Biotecnologia). B) Colônias obtidas pela ligação do vetor pcDNA5/FRT com a GBA. Padrão de tamanho de fragmento 1kb (LGC Biotecnologia).

As colônias 5, 6 e 9 transformadas com o vetor pcDNA3.1 e as colônias 3, 5, 6 e 7 transformadas com o vetor pcDNA5/FRT contêm o inserto do tamanho correto. Foram escolhidas duas colônias, uma de cada vetor, para verificação da orientação do inserto dentro do vetor de expressão. Estas colônias foram propagadas em meio seletivo e foi realizada a extração plasmidial dos caldos obtidos.

Os plasmídeos obtidos foram analisados por digestão enzimática (Figura 24). Os dois vetores de expressão utilizados nesse trabalho apresentam os sítios das enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII* nos seus sítios múltiplos de clonagem e estes dois sítios antecedem o sítio da enzima *NotI*, e por tanto, permaneceram intactos, mesmo após a clonagem. Essas enzimas clivam o gene da GBA, sendo que a *HindIII* cliva na base número 135 após o ATG inicial e a *BamHI* na base 1.533 após o ATG, quase no final do gene.

Desta maneira, se o gene estiver na posição correta, a digestão com a enzima *BamHI* gera dois fragmentos, um com 1,6kb e outro com o tamanho do vetor de expressão. Caso o inserto esteja na orientação contrária, será formado um fragmento do tamanho do vetor de expressão contendo o gene da GBA linearizado. Já com a enzima *HindIII*, são gerados dois fragmentos, um de aproximadamente 350pb e outro com mais de 6 kb. Caso o inserto esteja na posição inversa, os fragmentos terão tamanho de 1.5kb (tamanho da GBA menos 150pb) e um com o tamanho do vetor de expressão.

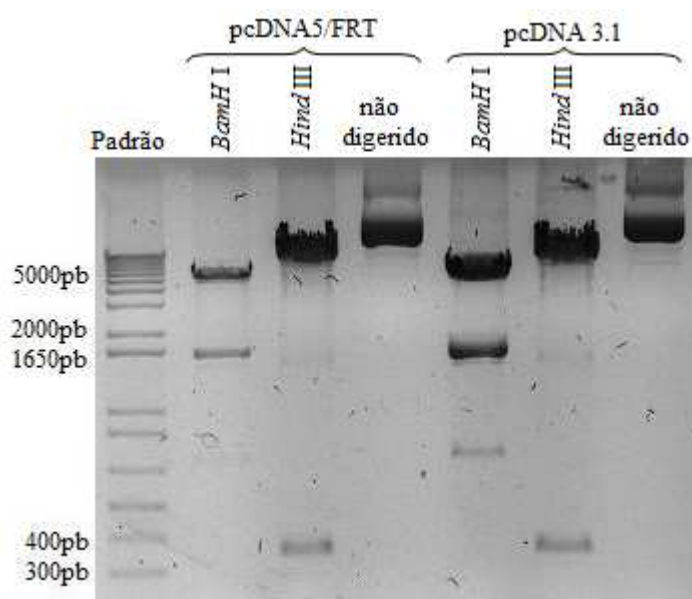


Figura 24: Digestão das colônias para verificação da orientação do inserto. Padrão de tamanho de fragmento 1kb (LGC Biotecnologia).

Através da observação dos fragmentos gerados pelas digestões, expostos na Figura 24, pode-se concluir que os insertos foram clonados no sentido correto dentro do vetor de expressão, estando prontos para uso nas transfecções de células.

4.2 TRANSFEÇÃO DAS DIFERENTES LINHAGENS CHO COM OS VETORES DE EXPRESSÃO

As linhagens celulares CHO.K1, CHO LEC 1.3 e CHO PRO5 foram transfectadas com o vetor pcDNA 3.1 contendo o gene da GBA, enquanto a linhagem CHO Flp-InTM foi transfectada com o vetor pcDNA5/FRT também contendo o gene da GBA. Após dois meses, as células que sobreviveram ao período de seleção foram consideradas uma população estável, na qual o vetor que confere resistência ao antibiótico e carrega o gene de interesse encontra-se estavelmente integrado ao cromossoma da célula. Desta maneira, a utilização de antibióticos no meio de cultivo se tornou desnecessária.

Uma população celular estável costuma ser bastante heterogênea, com células que expressam a proteína de interesse em diferentes níveis ou que podem simplesmente não expressá-la. O sistema Flp-inTM (Invitrogen) foi criado para reduzir essa heterogeneidade, uma vez que a célula somente sobreviverá se o vetor portando o gene de interesse houver se integrado no local específico de alta expressão, no qual se encontra o promotor e o ATG inicial do gene de resistência ao antibiótico higromicina.

4.3 ISOLAMENTO DE CLONES POR DILUIÇÃO LIMITE

Com a finalidade de selecionar as células com maiores níveis de produção da proteína de interesse, no caso a GBA, foi realizada uma seleção através de uma metodologia denominada diluição limite. Esta consiste na diluição de uma cultura até que um poço de cultivo possua apenas uma célula e, assim, esta única célula pode dar origem a uma colônia, na qual todas as células serão exatamente iguais à célula original, gerando uma população clonal.

A utilização de concentrações acima e abaixo da ideal (uma célula por poço) é realizada para corrigir eventuais variações decorrentes da contagem celular e da homogeneização da suspensão. Foram selecionados aqueles poços nos quais uma única célula deu origem a uma colônia e aqueles poços, nos quais havia mais de uma colônia, foram desprezados. No caso da figura 25, por exemplo, apenas o poço A representa uma população clonal. Os poços B e C foram descartados.

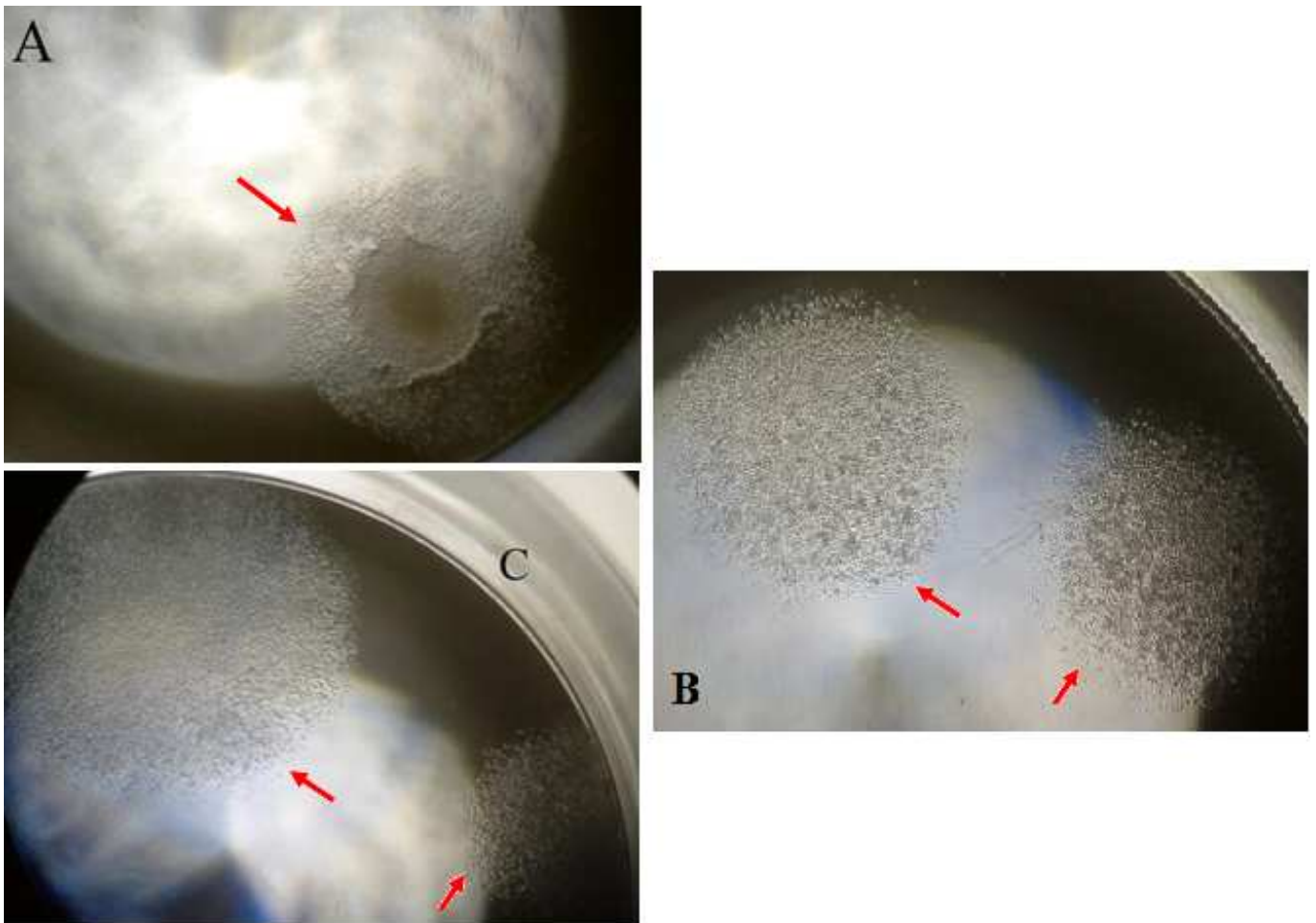


Figura 25: Fotos dos poços das placas de cultivo utilizadas para o isolamento de clones, tiradas 15 dias após a diluição limite. As colônias estão indicadas pelas setas vermelhas. A) Poço com apenas uma colônia, originada de uma única célula. B e C) Poços com duas colônias uniformes bem visíveis.

Os clones obtidos nas três placas de cada linhagem foram numerados e identificados com letras específicas. Os clones obtidos da linhagem celular CHO.K1 foram identificados com a letra “K”, os da CHO LEC 1.3 com a letra “L”, os da CHO PRO 5 com a letra “P” e os clones obtidos da CHO Flp-In™ foram identificados com a letra “F”. A eficiência de isolamento dos clones das quatro populações a partir das três suspensões utilizadas se encontra na Tabela 17.

Tabela 17: Quantidade de clones obtidos em cada placa de 96 poços utilizada para o isolamento de clones por diluição limite. Placa 1) 10 cél/mL ou 2 cél/poço; Placa 2) 5 cél/mL ou 1 cél/poço; Placa 3) 2,5 cél/mL ou 0,5 cél/poço.

Linhagem celular	Placa	Número de Clones	Eficiência	Total de clones
CHO.K1 + GBA	Placa 1K	18	18,75%	74
	Placa 2K	33	34,37%	
	Placa 3K	23	23,95%	
CHO PRO ⁵ + GBA	Placa 1P	17	17,7%	68
	Placa 2P	23	23,95%	
	Placa 3p	28	29,16%	
CHO LEC 1.3 + GBA	Placa 1L	25	26,04%	95
	Placa 2L	43	44,79%	
	Placa 3L	27	28,12%	
CHO Flp-In TM + GBA	Placa 1F	26	27,08%	87
	Placa 2F	36	37,5%	
	Placa 3F	25	26,04%	

Na Tabela 17, pode-se observar que, de fato, a diluição mais adequada para o isolamento de clones é a calculada para se obter uma célula por poço, uma vez que as demais diluições geram eficiências menores e bastante próximas entre si. No entanto, a seleção de clones com a linhagem CHO PRO⁵ gerou o menor número de clones e a maior eficiência foi atingida com a utilização da concentração média esperada de meia célula por poço. Isso pode ter ocorrido devido a uma contagem celular superestimada.

Anteriormente a esse isolamento de clones mostrado na Tabela 17, já havia sido realizado outro isolamento de clones por diluição limite. Contudo, nessa ocasião, devido a problemas de contaminação microbiana, diversos clones foram perdidos. No entanto, os clones que restaram serão analisados juntamente com os obtidos a partir do isolamento mostrado na Tabela 17. Para diferenciá-los, os clones selecionados anteriormente serão denominados “antigos”.

4.4 ANÁLISE DOS CLONES POR IMUNO-BLOT

Após aproximadamente três semanas, a célula original já havia dado origem a uma monocamada confluenta de células, a uma população clonal. Esta foi despreendida pela ação da tripsina e plaqueada em placas de 24 poços. Quando uma monocamada foi atingida, o sobrenadante foi recolhido e submetido a uma análise por imuno-*blot* para a determinação dos clones que mais produziam a β -glucocerebrosidase. Como as células comparadas foram obtidas a partir de uma mesma linhagem parental, quando os clones atingem a confluência presume-se que todos os poços apresentam a mesma concentração celular.

Em cada membrana, foram aplicados sobrenadantes de até 24 clones em duplicata. Para cada linhagem celular, aqueles cujas bandas foram mais expressivas, foram reunidos em uma nova membrana para a determinação dos melhores clones obtidos de cada linhagem transfectada.

As quatro membranas utilizadas para a análise dos sobrenadantes dos clones derivados da linhagem celular CHO.K1 transfectada com o vetor pcDNA3.1 contendo o gene da GBA estão ilustradas na Figura 26.

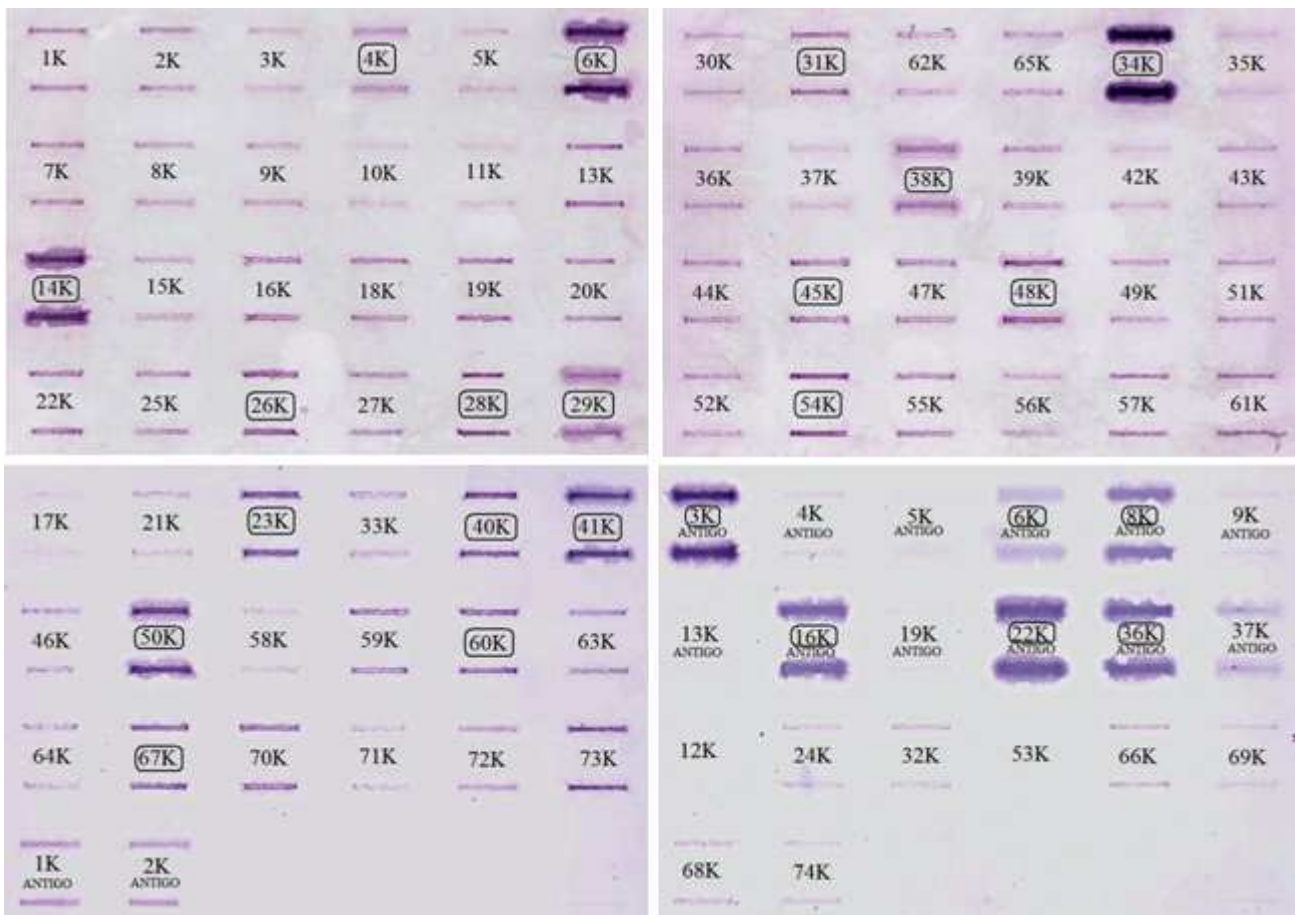


Figura 26: Membranas de imuno-*blot* para detecção da glucocerebrosidase no sobrenadante dos clones obtidos a partir da linhagem CHO.K1. Os melhores clones de cada membrana estão destacados com um retângulo ao redor de sua denominação.

Os seis melhores clones de cada uma das membranas, ilustradas na Figura 26, foram reunidos em uma única membrana para a escolha dos clones de CHO.K1 que mais secretaram a GBA (Figura 27).

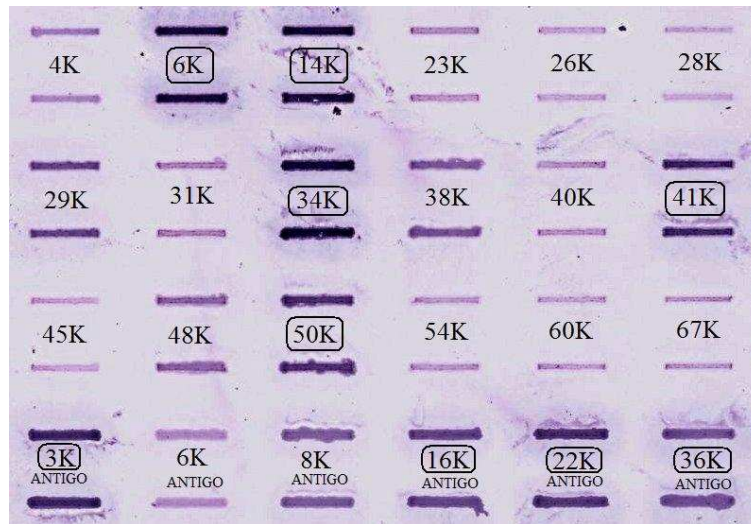


Figura 27: Membrana contendo os sobrenadantes dos seis melhores clones de CHO.K1 de cada uma das membranas anteriores. As nove bandas mais intensas estão destacadas.

Como muitos clones obtidos a partir da linhagem CHO.K1 apresentaram grande potencial de produção da proteína de interesse, nove clones foram selecionados (6K, 14K, 34K, 41K, 50K, 3K antigo, 16K antigo, 22K antigo e 36K antigo).

Como a eficiência da seleção de clones na linhagem CHO PRO5 foi a menor, foram necessárias somente três membranas para o *screening* por imuno-*blot*, como mostrado na Figura 28.

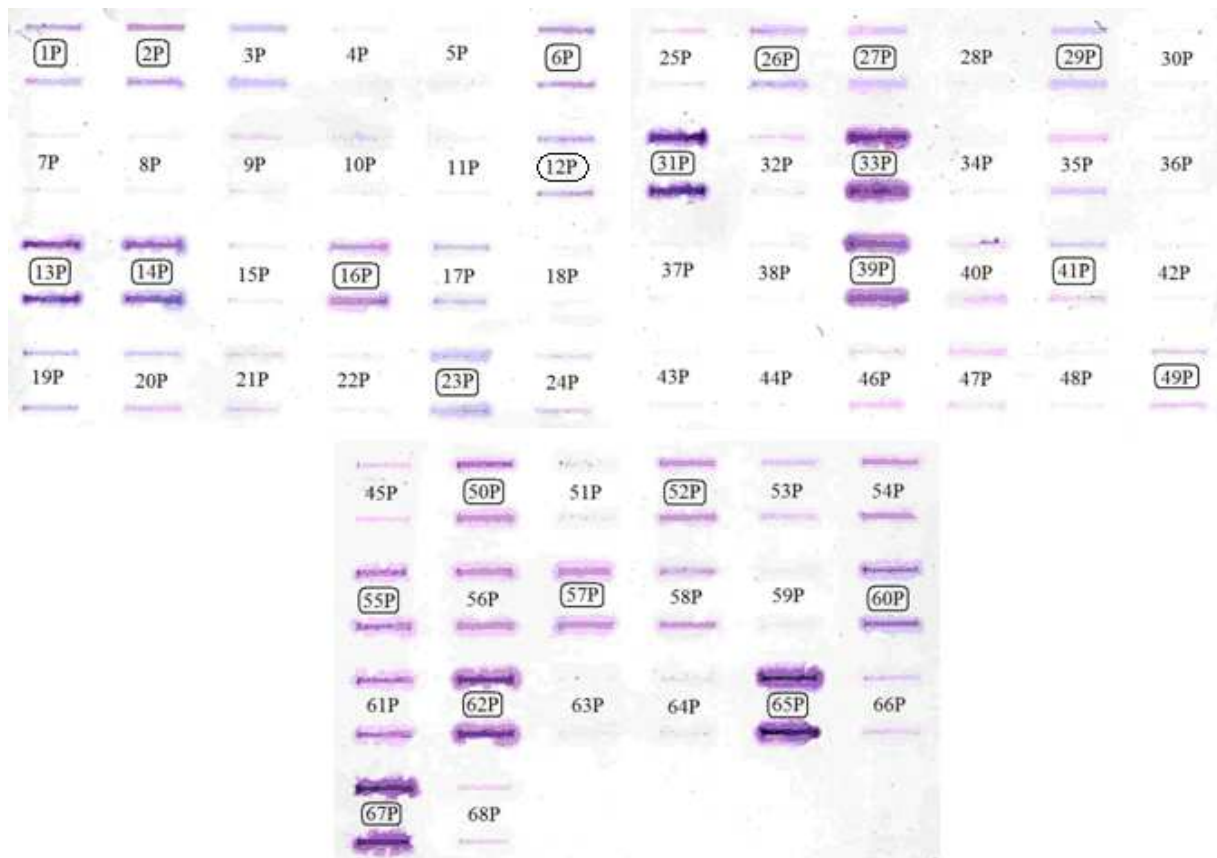


Figura 28: Membranas de imuno-*blot* para detecção da glucocerebrosidase no sobrenadante dos clones obtidos a partir da linhagem CHO PRO5.

Neste caso, foram selecionados os oito melhores clones de cada membrana para o procedimento de seleção em uma nova membrana (Figura 29).

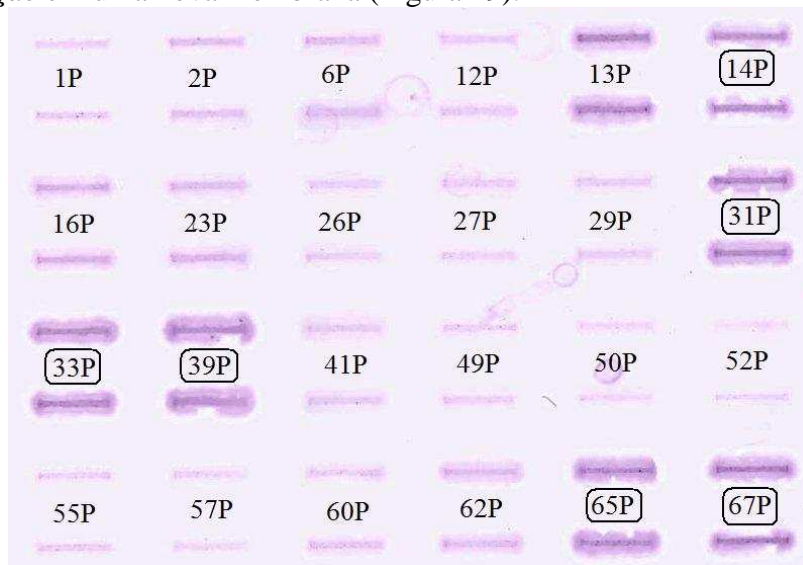


Figura 29: Membrana contendo os sobrenadantes dos oito melhores clones de CHO PRO 5 de cada uma das membranas anteriores.

Foram selecionados seis clones da linhagem celular CHO PRO 5 por possuírem uma boa produção da proteína recombinante de interesse (14P, 31P, 33P, 39P, 65P e 67P).

A Figura 30 mostra a análise por imuno-*blot* dos sobrenadantes dos clones derivados da linhagem celular CHO LEC 1.3. Foram necessárias quatro membranas para a análise dos clones obtidos.

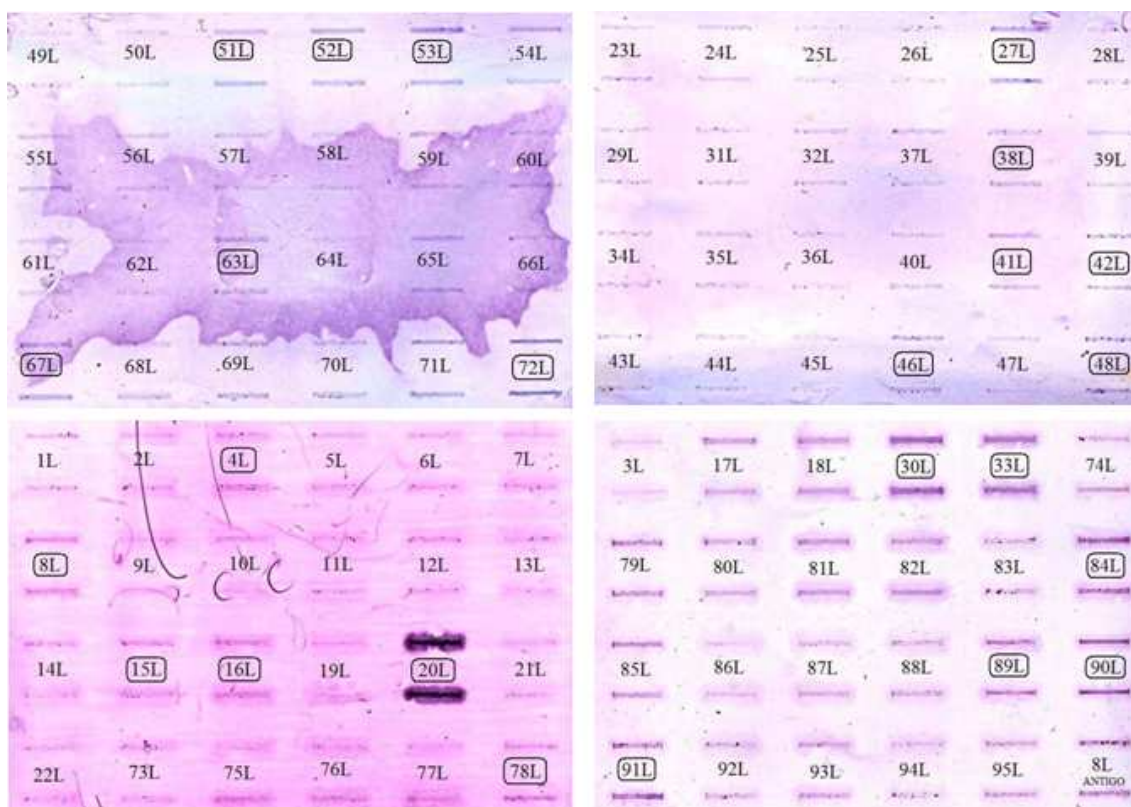


Figura 30: Membranas de imuno-*blot* para detecção da glucocerebrosidase no sobrenadante dos clones obtidos a partir da linhagem CHO LEC 1.3.

Os seis melhores clones obtidos de cada uma das membranas foram reunidos em uma única membrana para a escolha daqueles que melhor secretam a GBA (Figura 31).

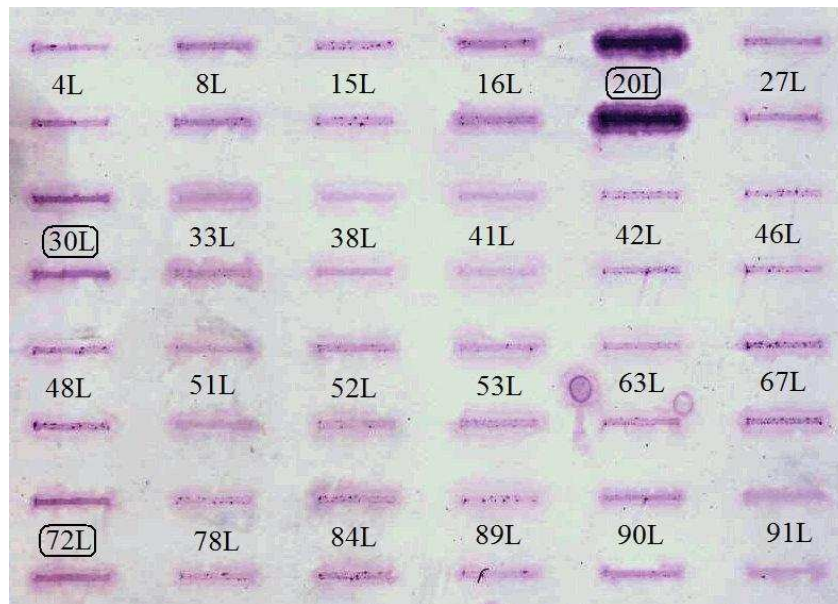


Figura 31: Membrana contendo os sobrenadantes dos seis melhores clones de CHO LEC1.3 de cada uma das membranas anteriores.

Dentre todos os noventa e seis clones analisados, apenas um deles parece ser bom produtor da glucocerebrosidase. Pode-se observar claramente, na Figura 31, que o clone 20L se destaca quando comparado aos demais. Como os outros clones parecem produzir pouca GBA, foram selecionados somente três clones da linhagem CHO LEC1.3.

Para o *screening* dos clones obtidos pela transfecção das células CHO Flp-In™ com o vetor de expressão pcDNA5/FRT, foram necessárias quatro membranas. Os noventa e três clones foram analisados (Figura 32) e aqueles seis que mais se destacaram em cada uma das membranas foram destacados.

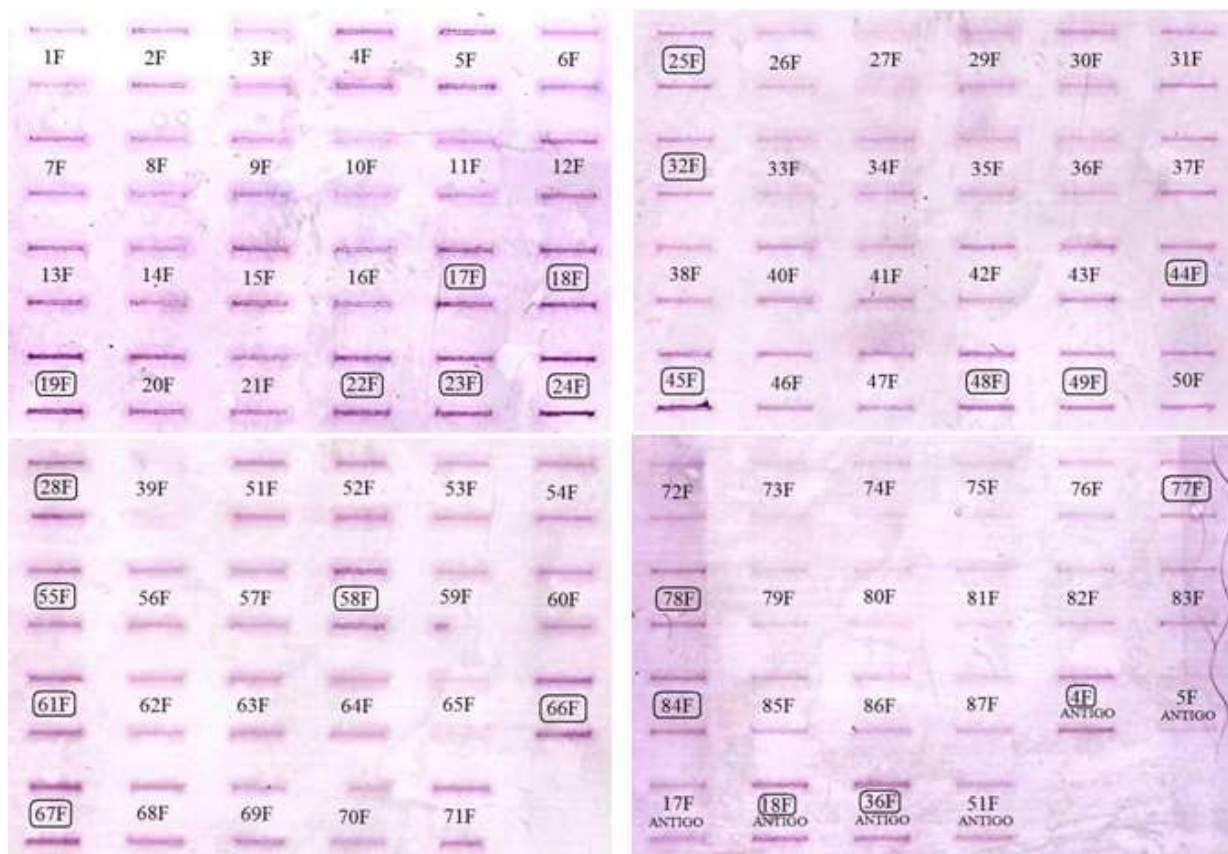


Figura 32: Membranas de imuno-blot para detecção da glucocerebrosidase no sobrenadante dos clones obtidos a partir da linhagem CHO Fpl-In™.

Os seis melhores clones de cada uma das quatro membranas da Figura 32 foram reunidos em uma nova membrana, mostrada na Figura 33.

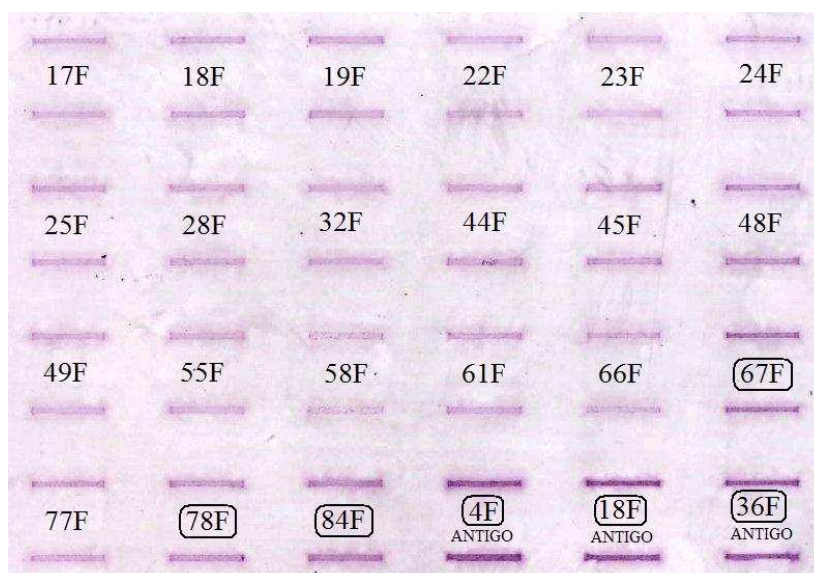


Figura 33: Membrana contendo os sobrenadantes dos seis melhores clones de CHO Fpl-In™ de cada uma das membranas anteriores.

Aparentemente, os clones derivados da linhagem celular CHO Fpl-In™ não apresentam altos níveis de produção da GBA, mas isso deverá ser avaliado mais profundamente adiante.

Após serem selecionados os nove melhores clones obtidos da linhagem CHO.K1, os seis de CHO PRO⁵, os três de CHO LEC1.3 e os seis de CHO Flp-InTM, estes foram retirados das placas de 24 poços e transferidos para placas de 6 poços, até que atingissem a confluência. Nesse ponto, os sobrenadantes foram recolhidos para a realização de um novo *imuno-blot*, dessa vez com todos os clones, de todas as linhagens, reunidos em uma mesma membrana (Figura 34).

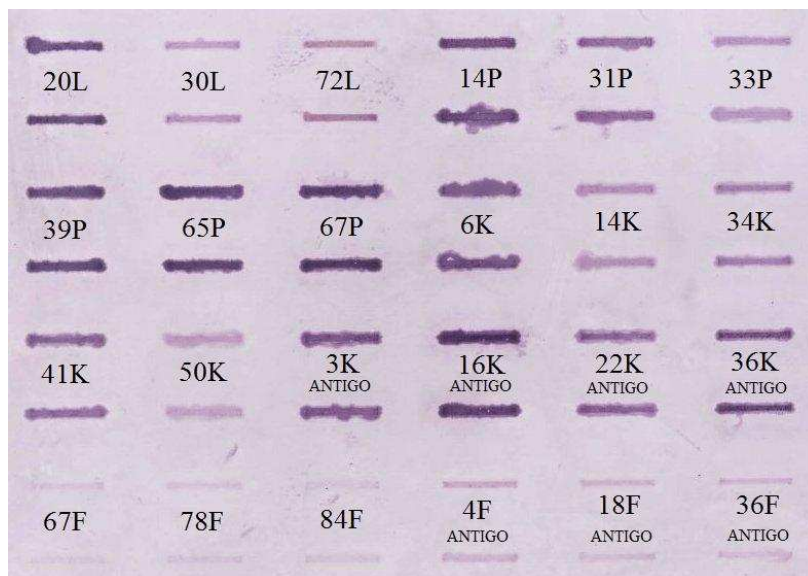


Figura 34: Membrana contendo os sobrenadantes dos melhores clones de cada uma das linhagens transfectadas com o gene da β -glucocerebrosidase.

A partir da membrana acima, pode-se confirmar que, ao contrário do que era originalmente esperado, os clones de CHO Flp-InTM são aqueles que menos produzem a GBA. Como na linhagem CHO Flp-InTM o gene de interesse se integra em uma região de alta expressão da célula, através de uma integração sítio dirigida, era originalmente esperada uma maior produção da proteína recombinante por essas células, ao contrário das demais linhagens celulares, nas quais ocorreu uma integração aleatória do gene heterólogo.

Dos três clones selecionados a partir de CHO LEC1.3, apenas o 20L aparenta produzir a β -glucocerebrosidase em quantidades significativas. No entanto, diversos clones das linhagens CHO.K1 e CHO PRO⁵ se mostraram excelentes produtores. Este resultado já era esperado, uma vez que as células mutantes LEC costumam apresentar baixos níveis de expressão de proteínas recombinantes (Kanda *et al.*, 2006). Todos os clones que chegaram a esta etapa, cujos sobrenadantes estão presentes na Figura 34, foram criopreservados.

4.5 ANÁLISE DA SECREÇÃO E DA ATIVIDADE DA β -GLUCOCEREBROSIDASE RECOMBINANTE

Para a realização de uma melhor caracterização da proteína recombinante produzida, foi realizado o cultivo dos melhores clones selecionados em placas de 6 poços, em duplicata. Linhagens não transfectadas também foram utilizadas, como controles negativos. Quando os poços atingiram a confluência, o sobrenadante foi retirado para a realização do ensaio de atividade e imuno-*blot*.

Para alguns clones, também foi realizada a análise por SDS-PAGE e *Western-blot*. Neste caso, os poços foram lavados três vezes e tiveram o meio de cultivo substituído por meio sem adição de soro fetal bovino, sendo o sobrenadante coletado após 72 horas. As células foram desprendidas pela ação da tripsina e utilizadas para a preparação de lisado celular.

Em grande parte dos artigos científicos relacionados à produção da β -glucocerebrosidase, a medida da atividade enzimática é realizada no lisado celular dos clones e calculada em μmol de 4-MU liberada/hora/mg de proteína (Fabrega *et al.*, 2000; Pasmanik-Chor *et al.*, 1996; Xu & Grabowski, 1998). No entanto, em alguns artigos, a atividade da glucocerebrosidase é medida no sobrenadante e expressa em $\mu\text{mol/hora/mL}$ de meio condicionado (Leonova & Grabowski, 2000; Bukovac *et al.*, 2008).

Como para a obtenção de um processo biotecnológico economicamente viável, é desejável que a proteína recombinante seja secretada pelas células produtoras, não é de interesse selecionar um clone que seja um excelente produtor, mas não consiga secretá-la.

Leonova & Grabowski (2000) observaram que a secreção da β -glucocerebrosidase é um processo dependente da glicosilação. Nesse estudo, células CHO produtoras de glucocerebrosidase capazes de secretar cerca de 80% da proteína superexpressa, quando tratadas com tunicamicina, um potente inibidor da *N*-glicosilação, perderam a capacidade de secretá-la, indicando que os oligossacarídeos possuem um papel ativo mediando a secreção.

Como, no presente trabalho, espera-se que a GBA seja produzida com diferentes padrões de glicosilação, devido à utilização de linhagens CHO diferentes, deve-se verificar se essas alterações levam a variações na secreção da proteína. Para isso, foi realizado um *Western-blot* com o sobrenadante e o lisado celular de um clone selecionado de cada linhagem (Figura 35).

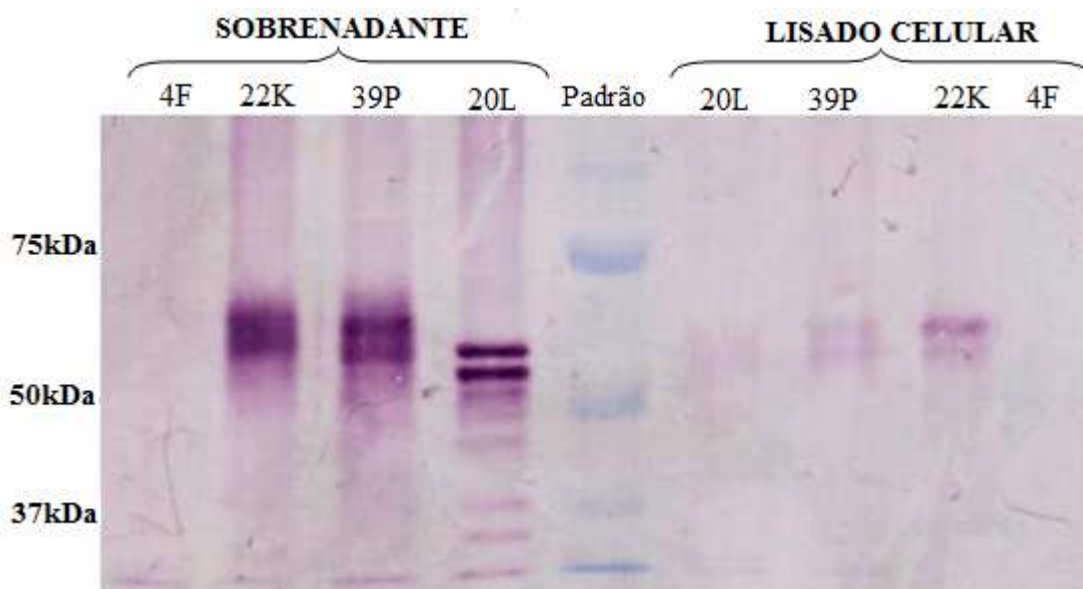


Figura 35: *Western-blot* realizado com amostras do sobrenadante e do lisado celular dos clones das diferentes linhagens. Padrão de massa molar (Precision Plus Prestained Standard – All Blue, Bio-Rad).

Através da análise da Figura 35, pode-se observar que a proteína produzida pelo clone 4F da linhagem CHO Flp-In™, presente nas raias 1 e 9, não pôde ser visualizada, provavelmente por estar sendo produzida em pouca quantidade. O clone 22K, presente nas raias 2 e 8, parece ser capaz de secretar cerca de 90% da GBA produzida. Pode-se observar que a banda presente na amostra do lisado celular se encontra na mesma altura (entre 60 a 70kDa) que a banda presente na amostra do sobrenadante, indicando que tanto a proteína secretada, como a que ficou retida dentro da célula, parecem apresentar o mesmo padrão de glicosilação.

O clone 39P, nas raias 3 e 7, parece ser capaz de secretar cerca de 95% da proteína produzida e, assim como no caso do clone 22K, as proteínas do sobrenadante e do lisado celular apresentam o mesmo tamanho. Já o clone 20L, nas raias 4 e 6, apresentou bandas de GBA com menor massa molar, indicando possuir *N*-glicanos bastante menos complexos do que os presentes nos clones derivados das linhagens CHO.K1 e da CHO PRO5, como será discutido no item 4.7. Além disso, este clone foi capaz de secretar aproximadamente 100% da GBA produzida, pois mal se consegue identificar bandas na amostra do lisado celular deste clone.

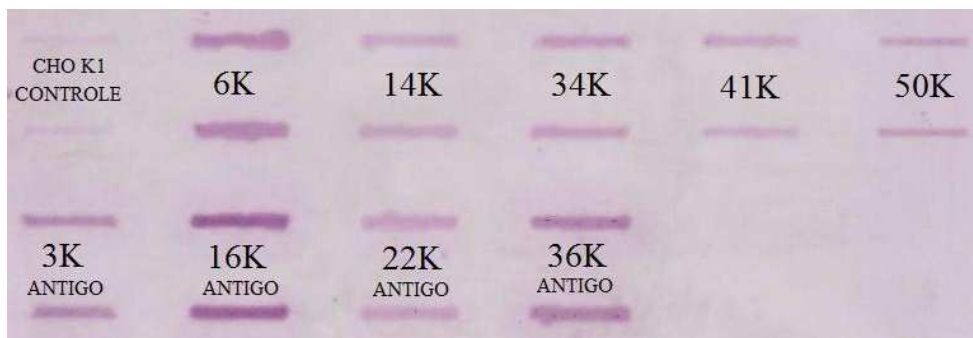
Dentro dessa perspectiva, a análise por *Western-blot* mostrou que a grande maioria da glucocerebrosidase produzida é realmente secretada e que isso independe do grau de complexidade dos oligossacarídeos presentes na glicoproteína. Considerando-se, portanto, que a GBA era majoritariamente secretada, o teste de atividade foi realizado com amostras do sobrenadante dos diferentes clones.

Para acompanhar o teste de atividade, um novo imuno-*blot* foi realizado com as mesmas amostras utilizadas para a medida da atividade. Neste, foram também incluídos sobrenadantes de células não transfectadas, como controles negativos. Para que pudesse ser realizada uma

comparação entre as atividades específicas das proteínas produzidas pelos diferentes clones, as intensidades das bandas do imuno-*blot* foram quantificadas (em pixels, utilizando o programa ImageQuant 5.2) e as respectivas atividades foram divididas por este valor.

Na Figura 36A e 36B estão representados o imuno-*blot* e os resultados do teste de atividade realizados com o sobrenadante dos clones de CHO.K1, respectivamente.

A)



B)

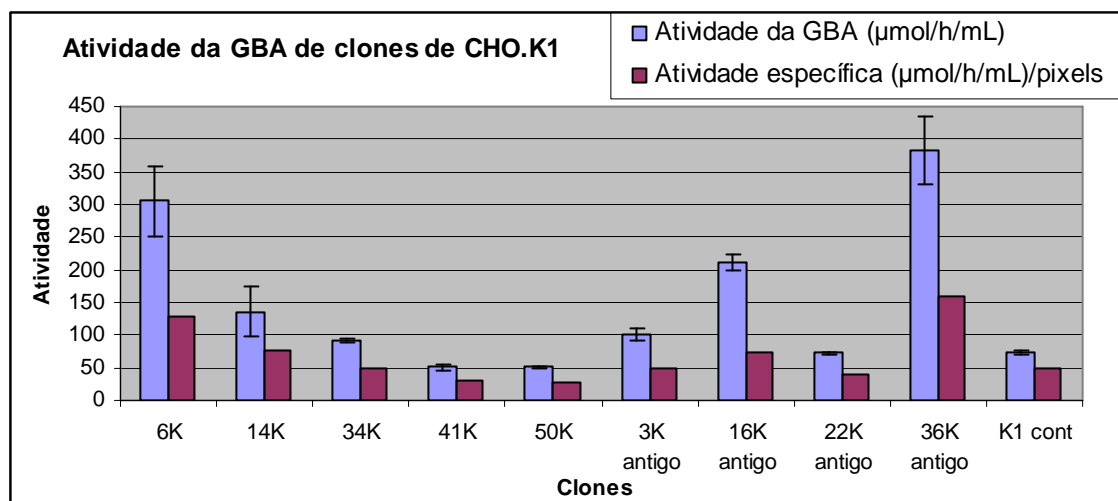


Figura 36: A) Análise por imuno-*blot* e da B) atividade enzimática dos nove clones obtidos a partir da linhagem CHO.K1.

Comparando os resultados obtidos no imuno-*blot* e no teste de atividade dos clones derivados de CHO.K1, podem-se observar algumas correlações entre a intensidade das bandas e a atividade enzimática. As três bandas mais fortes presentes no imuno-*blot*, dos clones 6K, 16K antigo e 36K antigo, correspondem aos três clones que apresentaram a maior atividade enzimática.

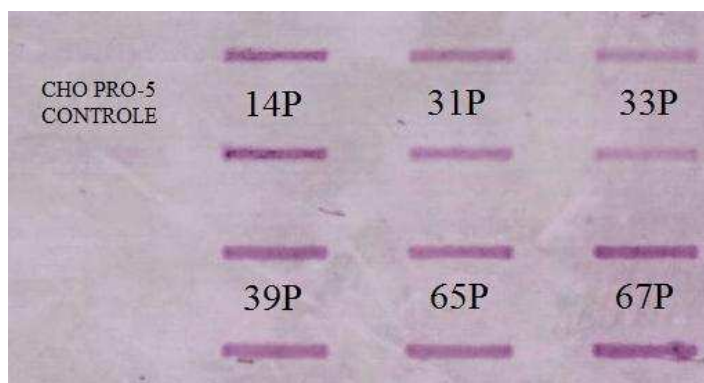
Já a proteína produzida pelo clone 14K não apresenta uma banda muito intensa, mas possui alta atividade, ou seja, apesar de não ser produzida em grandes quantidades pelas células tem uma alta atividade, levando a uma alta atividade específica.

Já os clones 41K e 50K apresentaram atividades enzimáticas, tanto a total quanto a específica, semelhantes à da CHO.K1 controle, ou seja, uma atividade residual, provavelmente

relativa à atividade da glucocerebrosidase endógena das células murinas. Esta também pode ser visualizada no imuno-*blot*, pois o anticorpo utilizado é capaz de reconhecê-la.

As análises de imuno-*blot* e de atividade da glucocerebrosidase realizadas com o sobrenadante dos clones de CHO PRO-5 podem ser visualizadas na Figura 37.

A)



B)

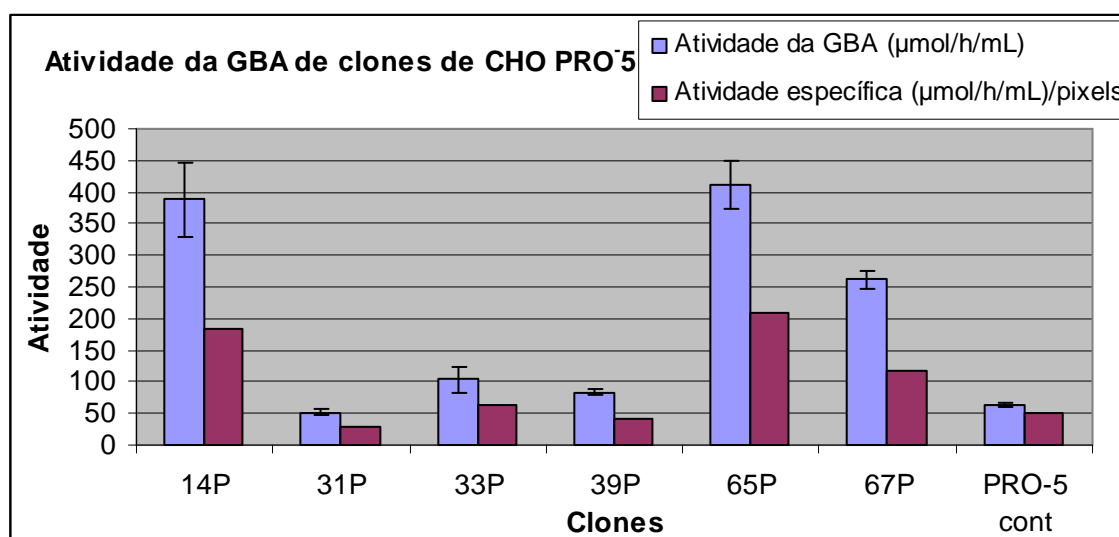
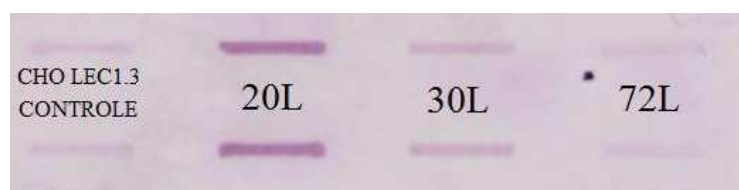


Figura 37: A) Análise por imuno-*blot* e da B) atividade enzimática dos seis clones obtidos a partir da linhagem CHO PRO-5.

Os três clones (14P, 65P e 67P) obtidos de CHO PRO-5 que se destacam no teste de atividade enzimática da glucocerebrosidase, tanto total quanto específica, também apresentam um sinal elevado na análise por imuno-*blot*. Já o clone 39P, pela análise de imuno-*blot*, também parece ser um bom produtor da glucocerebrosidase, porém a mesma parece estar em parte inativa, visto que a atividade enzimática apresentada pela GBA produzida por esse clone é muito baixa, sendo apenas ligeiramente superior à atividade residual encontrada nas células parentais.

As análises de imuno-*blot* e atividade da GBA de clones de CHO LEC1.3 estão expostas na Figura 38.

A)



B)

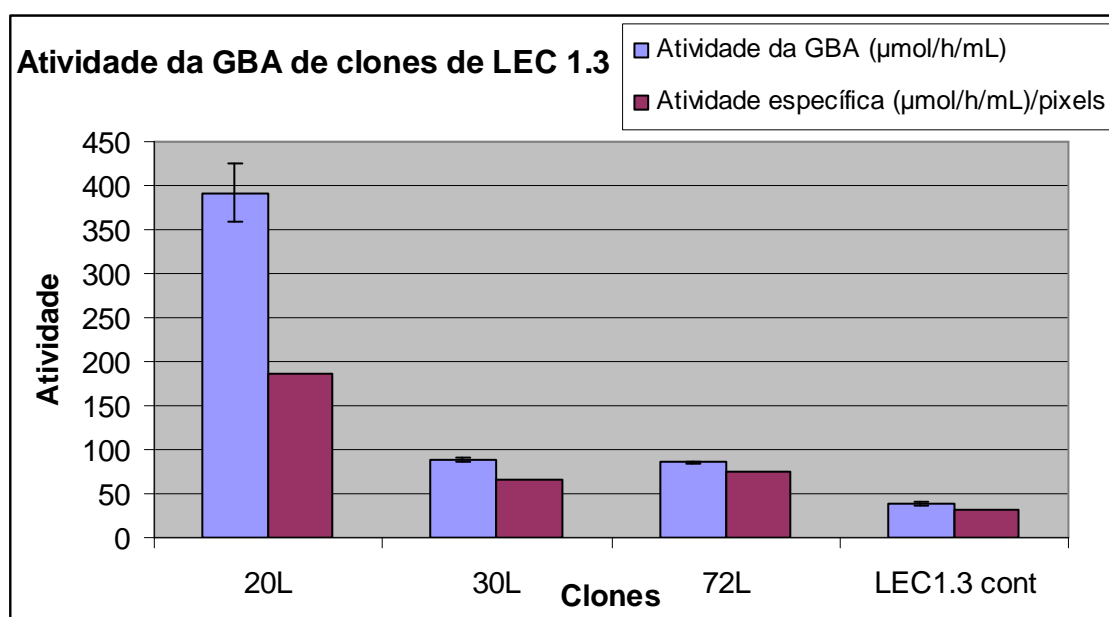


Figura 38: A) Análise por imuno-*blot* e da B) atividade enzimática dos três clones obtidos a partir da linhagem CHO LEC 1.3.

Dentre os clones obtidos a partir de CHO LEC1.3, assim como no imuno-*blot*, o clone 20L também se destacou no ensaio de atividade, mostrando a maior atividade específica. Já os outros dois clones (30L e 72L) apresentaram uma atividade total cerca de 4 vezes inferior a proteína produzida pelo clone 20L e, ligeiramente maior do que as células CHO LEC 1.3 controle. A atividade total, assim como a atividade específica, desses dois clones foram bastante semelhantes entre si.

A Figura 39 mostra os resultados obtidos no imuno-*blot* e no teste de atividade da GBA no sobrenadante de clones de CHO Flp-InTM.

A)



B)

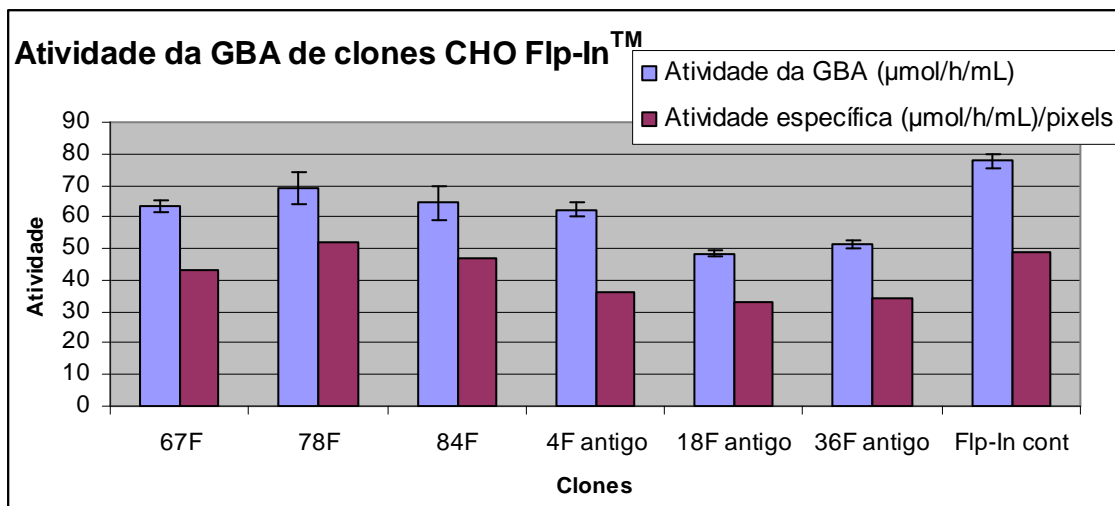


Figura 39: A) Análise por imuno-*blot* e da B) atividade enzimática dos seis clones obtidos a partir da linhagem CHO FIp-In™.

No imuno-*blot* realizado com os sobrenadantes dos clones selecionados a partir da linhagem CHO FIp-In™ transfectada, pode-se observar que as bandas são muito similares entre si e ao controle da CHO FIp-In™ não transfectada. Já com relação à atividade total, surpreendentemente a atividade dos clones foi ligeiramente inferior à atividade do controle negativo (células CHO FIp-In™ não transfectadas).

Cabe ressaltar que, no caso das quatro linhagens parentais testadas como controle negativo, foram obtidos níveis de atividade baixos (40-80 $\mu\text{mol/h/mL}$), provavelmente decorrentes da presença de GBA endógena de hamster.

A Figura 40 apresenta uma comparação das atividades totais e específicas da GBA obtidas nos sobrenadantes dos clones selecionados de todas as linhagens utilizadas.

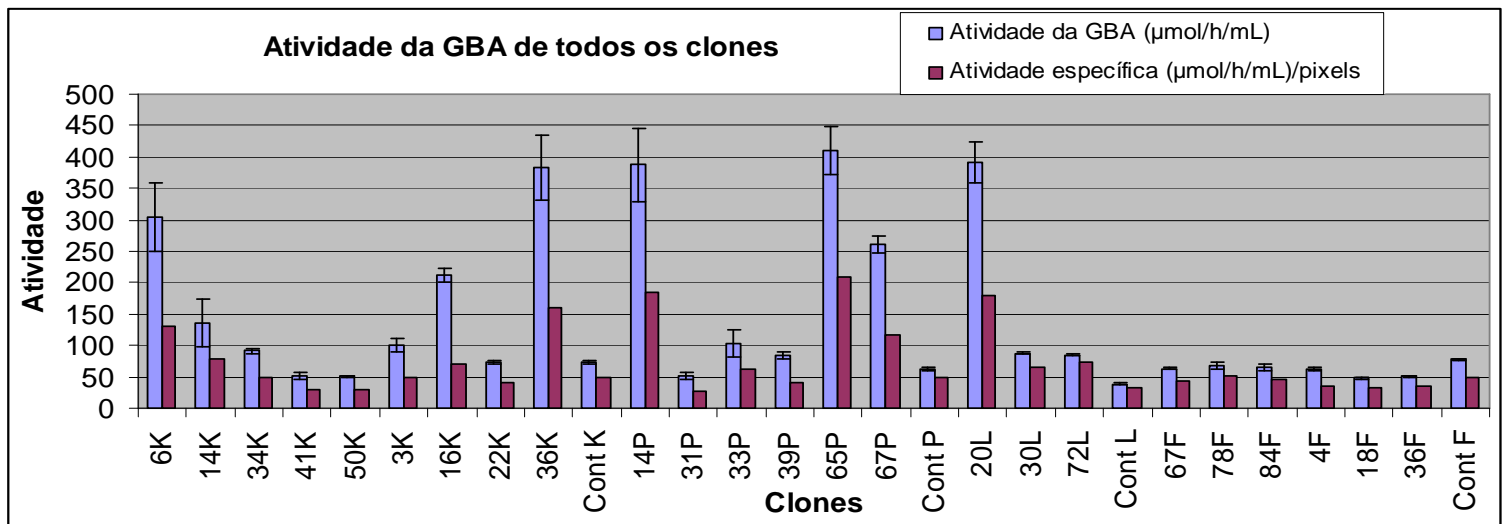


Figura 40: Análise da atividade enzimática obtida nos sobrenadantes de todos os clones selecionados de todas as linhagens.

Através da análise da Figura 40 pode-se observar que, de fato, a atividade enzimática de todos os clones da CHO Flp-InTM, assim como ocorreu no imuno-*blot*, foi bastante inferior à dos demais clones das outras linhagens. No entanto, podem-se destacar alguns clones que apresentaram alta atividade enzimática, tais como os clones 36K antigo, 14P, 65P e 20L.

4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GBA POR PCR EM TEMPO REAL

Após a extração do RNA das amostras de células dos diferentes clones, foi realizada uma reação de PCR em tempo real para avaliar a temperatura de anelamento que seria utilizada para os *primers* e a especificidade das reações, através da análise da curva de dissociação.

Como a temperatura de fusão prevista para os *primers* da GBA era de 60°C, foi realizado um gradiente de temperaturas de 61 a 71°C, para verificar qual delas resultaria em uma melhor amplificação e curva de dissociação.

A mesma amostra de cDNA, sintetizada a partir do RNAm extraído do clone 3K (escolhido de forma aleatória), foi utilizada para todos os experimentos. Os resultados obtidos estão na Figura 41.

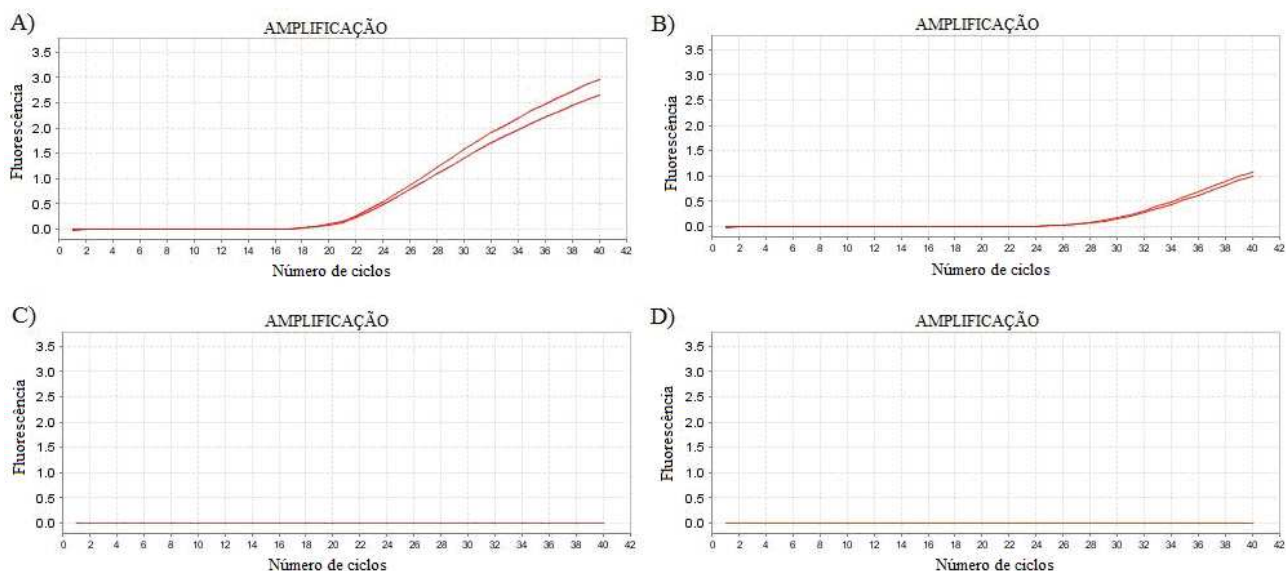


Figura 41: Amplificação do cDNA obtido do clone 3K com os *primers* da GBA a diferentes temperaturas de anelamento, em duplicata. A) Temperatura de anelamento de 61°C; B) Temperatura de anelamento de 63°C; C) Temperatura de anelamento de 65°C; D) Temperatura de anelamento de 67°C.

Através dos dados obtidos para a amplificação, pode-se observar que a temperaturas mais elevadas, como 65 e 67°C, não ocorre a amplificação do fragmento de interesse, sendo observada somente uma linha basal de fluorescência. Isso ocorre, pois a temperaturas mais elevadas as moléculas estão mais agitadas, dificultando o anelamento dos *primers*, o qual dá início ao processo de amplificação por PCR.

Já na Figura 41A e 41B, fica claro o aumento do nível da fluorescência observada com o início da amplificação. Este aumento é mais rápido na Figura 41A, na qual ocorre próximo ao ciclo 20, quando comparado à Figura 41B, na qual este aumento ocorre somente próximo ao ciclo 28. Sendo assim, pode-se dizer que a reação tem maior sensibilidade quando a temperatura de anelamento utilizada é 61 °C.

Foram, então, realizadas análises das curvas de dissociação nas condições estabelecidas (61 e 63°C). Estas análises estão ilustradas na Figura 42.

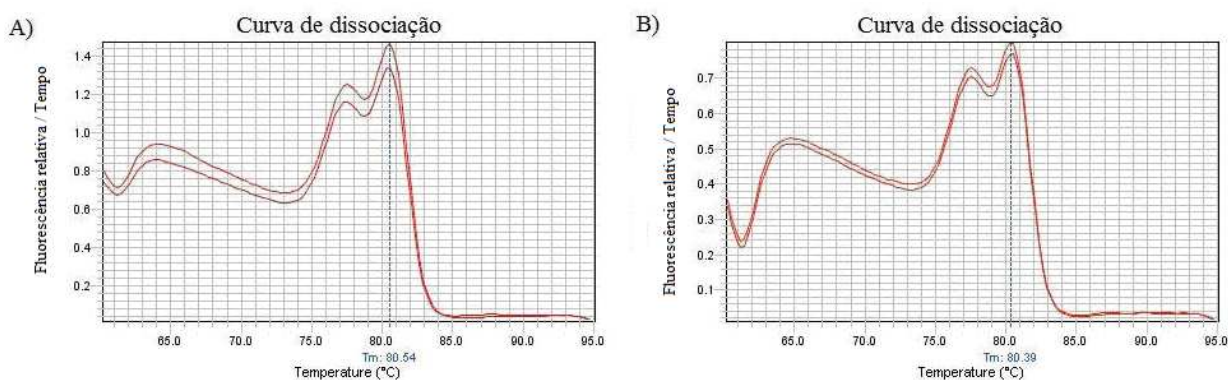


Figura 42: Curvas de dissociação obtidas a partir dos produtos de PCR oriundos do clone 3K, com os *primers* da GBA, a diferentes temperaturas de anelamento, em duplicata. A) Temperatura de anelamento de 61°C; B) Temperatura de anelamento de 63°C.

Os resultados das Figuras 42A e 42B mostram um perfil muito semelhante, no qual a curva de dissociação apresenta dois picos diferentes. Isto não é o ideal para um PCR em tempo real, uma vez que a presença de dois picos bem distintos indica que estão sendo amplificados dois produtos diferentes. No caso, pode-se excluir a formação de um dímero de *primers*, pois a temperatura de fusão dos produtos amplificados é muito alta. Esse problema de formação de produtos não pôde ser solucionado com a variação da temperatura de anelamento, uma vez que temperaturas inferiores a 61°C não levam a amplificação do produto de PCR, assim como temperaturas superiores a 63 °C.

A formação de dois produtos diferentes pode ocorrer devido a variações no RNA mensageiro. Bukovac *et al.* (2008) relataram a presença de um sítio de *splicing* críptico no RNAm da glucocerebrosidase, gerando dois produtos de amplificação diferentes nas análises por PCR em tempo real.

O *splicing* é uma etapa pela qual o pré-RNAm passa, para a retirada dos íntrons de sua sequência. Nesse processo, é realizado o reconhecimento das junções éxon-íntron, conhecidas como sítios 5' e 3' de *splicing*, que são conservadas em termos de sequência. Mutações nesses sítios específicos podem levar ao reconhecimento de sítios de *splicing* alternativos, gerando RNAm anormais (Královicová & Vorechovsky, 2007).

Existem algumas ferramentas de bioinformática disponíveis na Internet capazes de prever, através da utilização de matrizes específicas, a possibilidade de ocorrência de sítios de *splicing* em sequências de DNA e RNA. A região do cDNA da glucocerebrosidase próxima aos sítios de anelamento dos *primers* desenhados para o PCR em tempo real foi analisada em dois desses sites (<http://es.embnet.org/~mwang/assp.html> e http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/splice.html) (Wang & Marín, 2006; Roca *et al.*, 2003). O resultado desta análise encontra-se na Figura 43.

```
cagaacagaaGTTCCAGAAgtgaagggatttggagggggc
catgacagatgctgctgctctcaacatccttgccctgtca
ccccctgccc aaaatttgctacttaa atcgtacttctctg
aagAAGGAATCGGatataacatcatccggGTacccatggcc
```

Figura 43: A figura mostra os *primers* utilizados para o PCR em tempo real (em azul) e os possíveis sítios de reconhecimento de *splicing* crípticos (em caixa alta), dentro dos quais estão destacados os sítios de clivagem (em vermelho), preditos por meio das ferramentas de bioinformática.

Com base nestes dados, os dois picos obtidos na curva de dissociação (Figura 42) foram considerados produtos de PCR de formas alternativas de *splicing* que podem estar ocorrendo nas células CHO. Optou-se pela temperatura de 61°C para a realização dos ensaios de PCR, devido à maior sensibilidade de amplificação obtida (Figura 41).

Foram realizadas duas curvas padrão utilizando diluições sucessivas do cDNA de uma amostra, com os *primers* específicos da GBA (Figura 44A) e com os *primers* da β -actina (Figura 44B), para o cálculo da eficiência de amplificação dos *primers*. Em cada uma das placas utilizadas para as análises de PCR em tempo real, foram corridas as duas curvas padrão em duplicata.

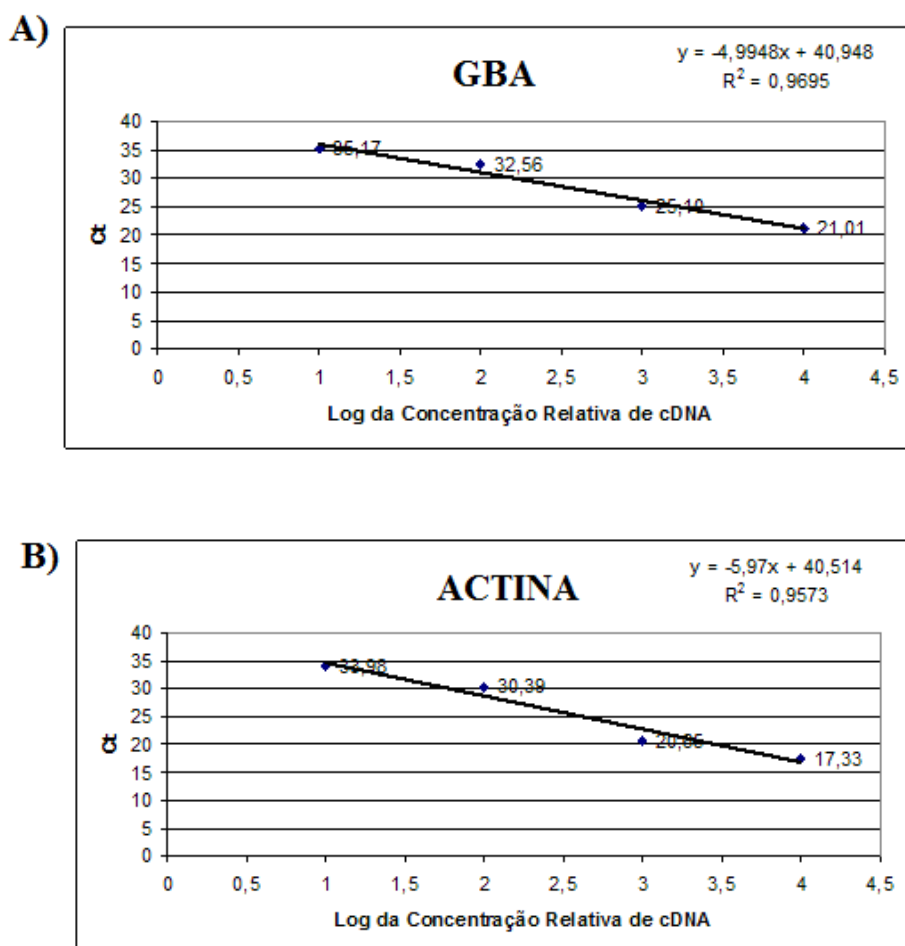


Figura 44: Curva padrão com diluições do cDNA do clone 3K para cálculo da eficiência de amplificação dos primers da GBA (A) e da β -actina (B) na primeira placa de PCR em tempo real.

A partir dos coeficientes angulares das retas obtidas nos dois gráficos da Figura 44 e utilizando a equação (1) (página 47), foram calculadas as eficiências de amplificação. Os resultados obtidos foram de 58% para a GBA e de 47% para a actina. Estes valores foram utilizados para correção dos valores de Ct obtidos em todas as análises realizadas na primeira placa.

A expressão da glucocerebrosidase pelo controle negativo, ou seja, pela linhagem CHO.K1 não transfectada, foi nula. Como os resultados de PCR em tempo real se baseiam na razão entre a expressão em dada condição e a expressão no caso controle, não se pode adotar uma expressão totalmente nula como controle, uma vez que a divisão por zero não é matematicamente possível. Sendo assim, em cada grupo de clones derivados de uma dada linhagem, o clone que menos expressou a GBA foi adotado como controle para os cálculos relativos à sua linhagem. Assim

sendo, no caso dos clones derivados de CHO.K1, o clone 14K foi aquele utilizado como controle. Por isso, a sua expressão relativa ao controle é igual a um, como pode ser observado na Figura 45.

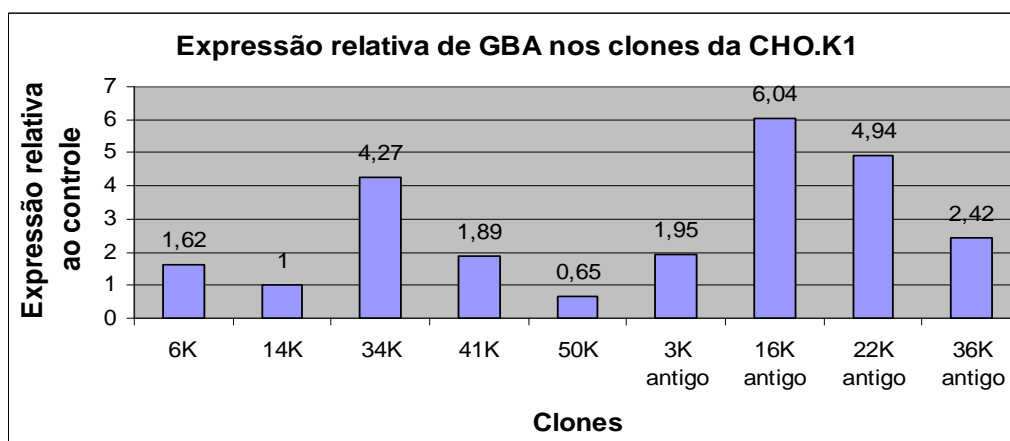


Figura 45: Análise de expressão relativa de GBA, por PCR em tempo real, pelos clones derivados da linhagem celular CHO.K1.

Com base nesses dados, observa-se uma alta expressão dos clones 16K antigo, 22K antigo e 34K. No entanto, quando se correlacionam esses dados com aqueles obtidos no imuno-*blot* e no teste de atividade enzimática, observa-se que alguns dos clones que apresentam por PCR em tempo real a maior expressão da GBA, como os clones 34K e 22K, não são aqueles que apresentam nem a banda mais intensa do imuno-*blot* e nem a maior atividade. Os dados das medidas pelas três técnicas só são coincidentes para o clone 16K, que apresenta a maior expressão e a banda mais intensa do imuno-*blot*, com uma atividade enzimática relativamente elevada.

As análises de expressão por PCR em tempo real dos clones de CHO Flp-In™ estão expostas na Figura 45.

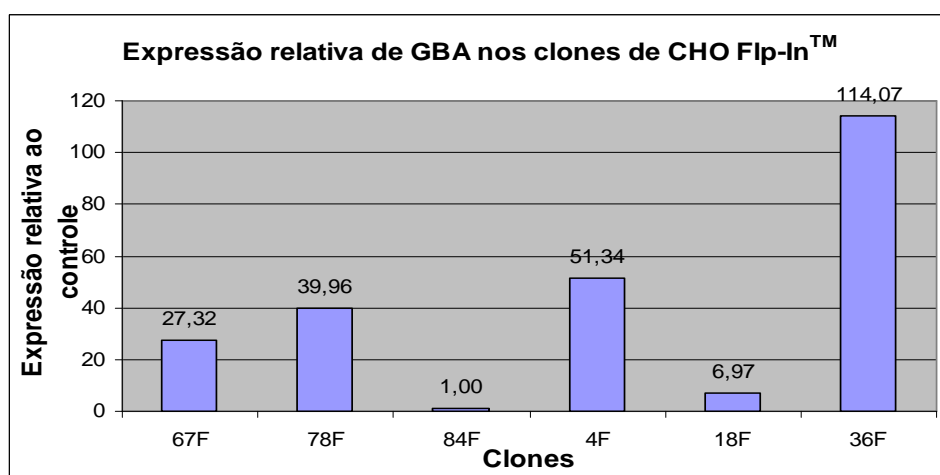


Figura 45: Análise de expressão relativa de GBA, por PCR em tempo real, dos clones derivados da linhagem celular CHO Flp-In™.

Ao contrário do que se esperaria para um sistema de integração sítio-dirigida, o qual se propõe a gerar uma linhagem isogênica de alta expressão, observam-se na Figura 46 variações

muito grandes na expressão da glucocerebrosidase pelos diferentes clones. O clone 36F chega a expressar 114 vezes mais do que o clone 84F, utilizado nessa linhagem celular como controle, por apresentar a menor expressão de GBA. Essa expressão bastante variada também não pode ser correlacionada de forma coerente com os resultados obtidos no imuno-*blot* e no teste de atividade, nos quais todos os clones pareciam ser bastante homogêneos.

A comparação dos dados de PCR em tempo real para os clones de CHO.K1 e de CHO Flp-InTM está exposta na Figura 47.

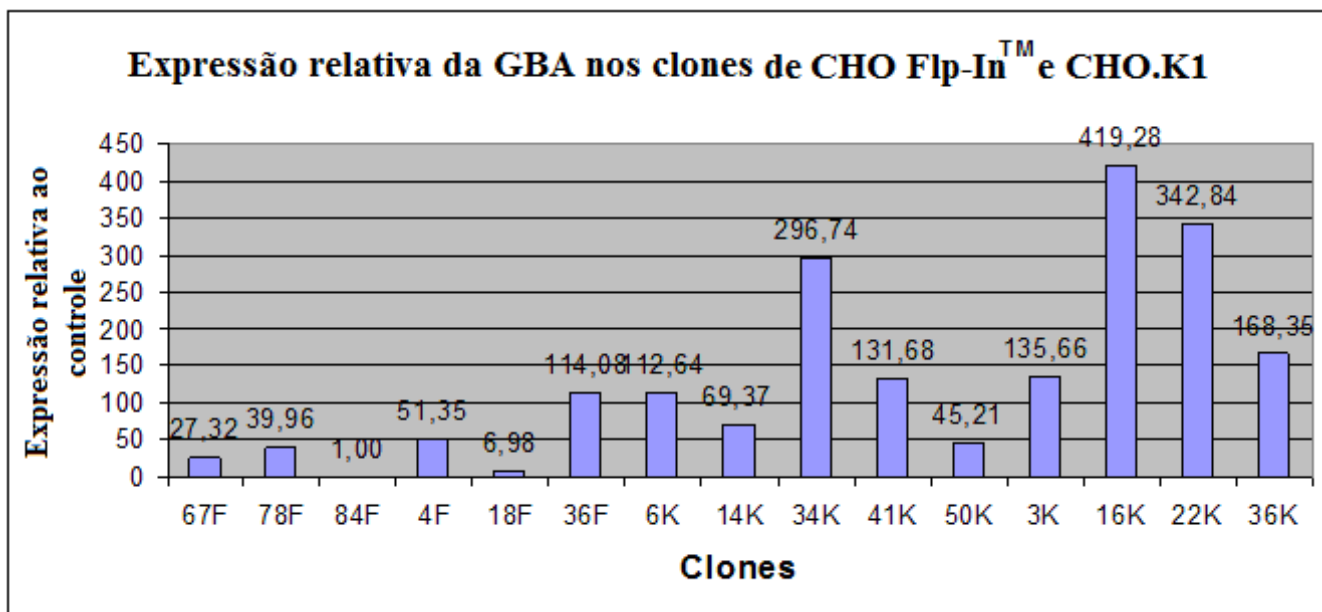


Figura 47: Análise de expressão comparativa da GBA, por PCR em tempo real, dos clones derivados da linhagem celular CHO Flp-InTM e CHO.K1.

A análise comparativa entre os clones de diferentes linhagens só pode ser feita dentre aqueles que foram corridos na mesma placa de reação, portanto não foi possível inserir os clones das demais linhagens nesta comparação. Nesta, o clone 84F foi adotado como controle, uma vez que este foi o clone que menos expressou a GBA.

Pode-se observar que as células derivadas do sistema de integração sítio-dirigida não apresentaram maior expressão do gene de interesse do que as células derivadas de um sistema de integração aleatória, como a célula CHO.K1 transfectada com o pcDNA3.1. Na realidade, a expressão obtida dentre os clones selecionados de CHO.K1 foi bastante mais homogênea do que dentre os clones selecionados de CHO Flp-InTM, tendo a variação sido de 9 vezes para a CHO.K1 e de 114 vezes para a CHO Flp-InTM.

Como todas as amostras extraídas dos clones não couberam em somente uma placa, outra placa foi submetida à reação de PCR em tempo real. Sendo assim, duas novas curvas padrão em duplicata tiveram que ser preparadas para o cálculo da eficiência de reação (Figura 48).

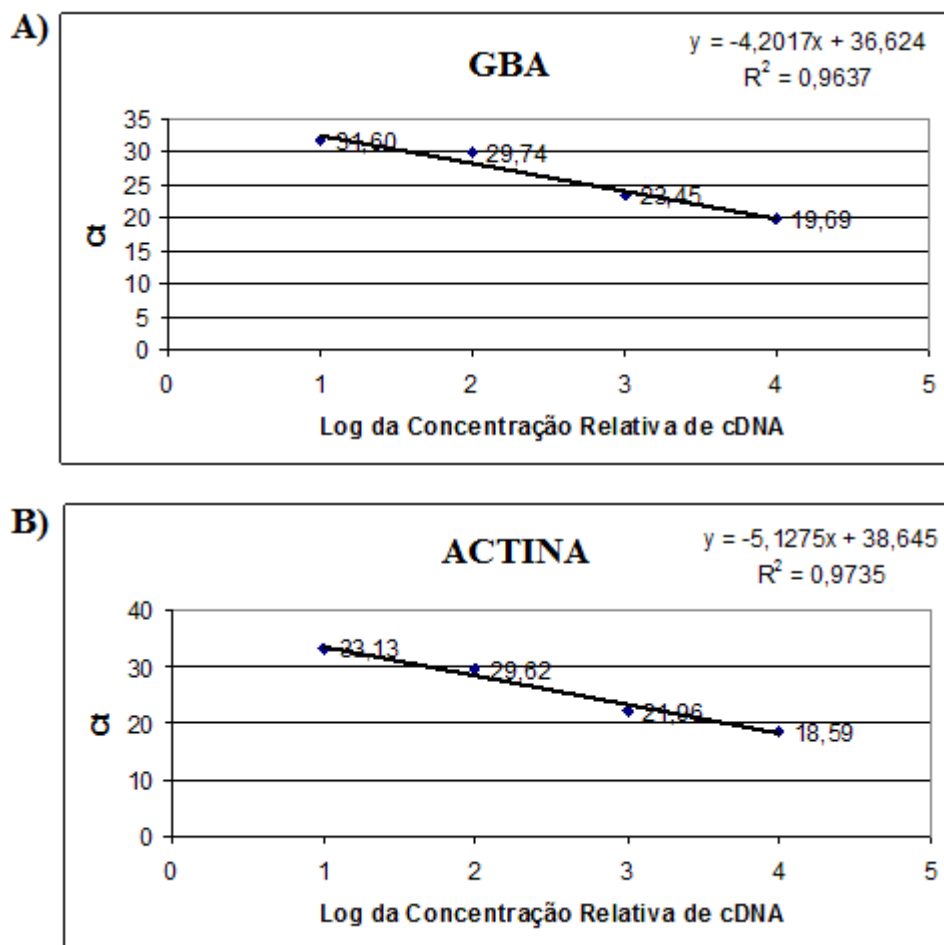


Figura 48: Curva padrão com diluições do cDNA do clone 31P para cálculo da eficiência de amplificação dos *primers* da GBA e da β -actina na segunda placa de PCR em tempo real.

A partir dos coeficientes angulares das retas obtidas nos dois novos gráficos, foi realizado o cálculo da eficiência, obtendo-se 73% para a GBA e 56% para a actina. Esses valores foram utilizados para correção dos novos dados, referentes aos clones derivados de CHO PRO 5 (Figura 49) e CHO LEC 1.3 (Figura 50).

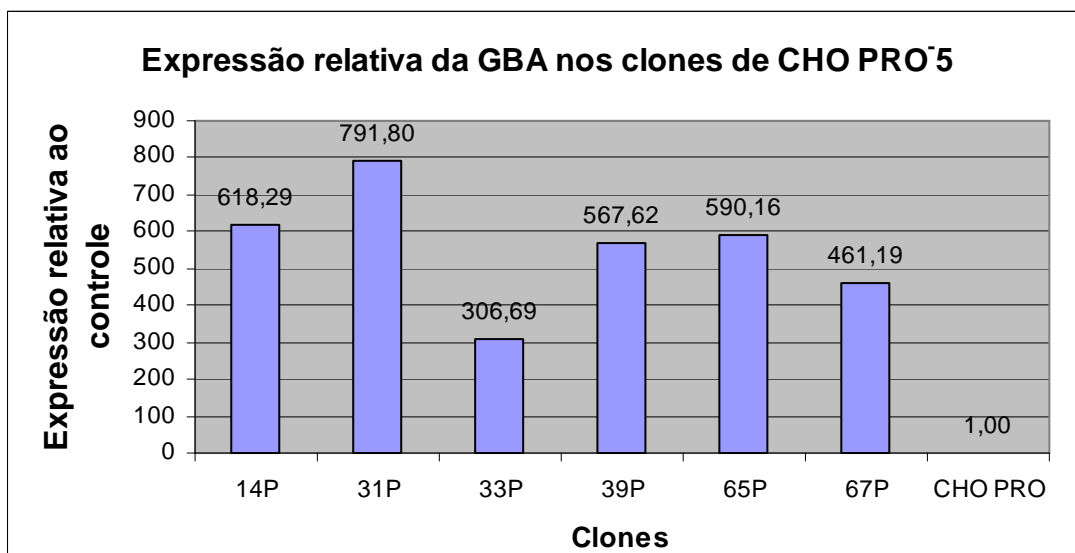


Figura 49: Análise de expressão relativa da GBA por PCR em tempo real, para os clones derivados da linhagem celular CHO PRO5.

No caso da linhagem celular CHO PRO5, uma expressão da glucocerebrosidase pelas células controle, não transfectadas, ainda que muito baixa, pôde ser detectada. Sendo assim, esta foi adotada como controle.

O clone 31P, que apresentou a maior expressão relativa da GBA, como observado na figura 49, foi o que apresentou a menor atividade no teste enzimático e uma das bandas menos intensas do imuno-*blot*. Já os clones 14P, 65P e 67P, que apresentaram boa atividade enzimática e bandas intensas no imuno-*blot*, não se destacam dos demais clones com relação à expressão relativa, medida por PCR em tempo real.

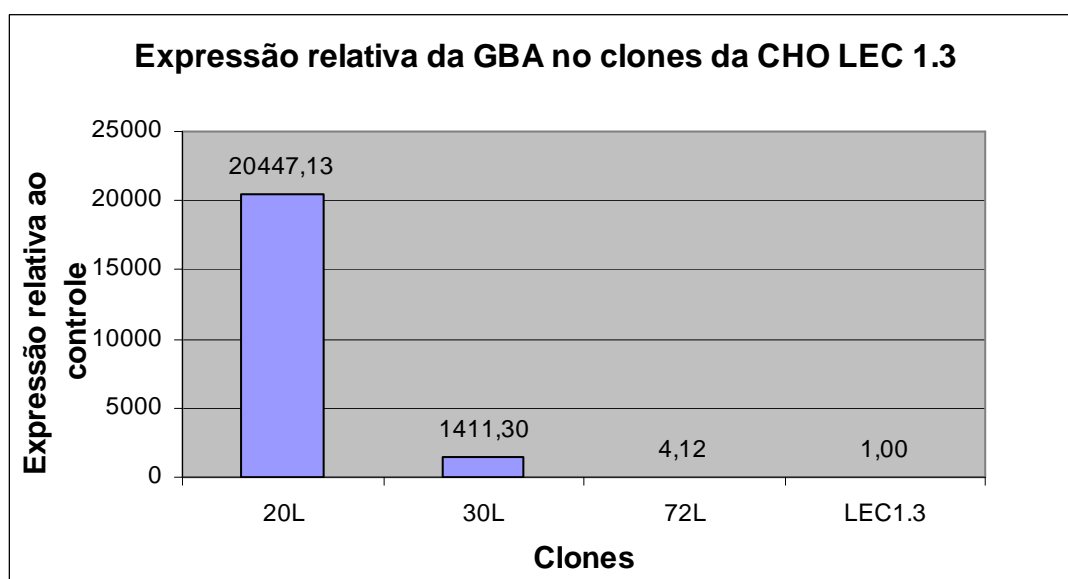


Figura 50: Análise de expressão relativa da GBA por PCR em tempo real, para os clones derivados da linhagem celular LEC1.3.

Assim como a linhagem CHO PRO⁵, a linhagem CHO LEC 1.3 não transfectada também apresentou expressão não nula da glucocerebrosidase, tendo sido adotada como controle para os cálculos do PCR em tempo real.

O clone 20L, que claramente se destacou tanto no teste de atividade enzimática quanto no imuno-*blot*, também mostrou grande superioridade na expressão relativa da GBA, quando comparado aos demais clones (30L e 72L). Dentre estes, o clone 30L expressa cerca de 340 vezes mais a glucocerebrosidase do que o clone 72L, cuja expressão é apenas 4 vezes maior do que o controle. Esse resultado também está de acordo com aqueles obtidos nos imuno-*blot* e nos testes de atividade.

Como em diversos clones não houve uma correlação direta entre a expressão relativa da glucocerebrosidase, a intensidade da banda no imuno-*blot* e a atividade enzimática, pode-se questionar a eficiência de tradução dessa proteína.

Estudos de superexpressão do RNAm da GBA em diversos tipos celulares de mamífero, inclusive células CHO, mostraram uma discrepância, superior a 100 vezes, entre a expressão de RNAm e a produção da GBA. Esse fato foi atribuído à presença de uma proteína constitutiva de controle traducional, que se liga à fita dupla de RNAm da glucocerebrosidase (Xu & Grabowski, 1998). Provavelmente, isto está ocorrendo com muitos dos clones selecionados, nos quais foram observadas diferenças entre a quantidade de proteína detectada no sobrenadante e a sua expressão relativa.

4.7 DISCUSSÃO DO PERFIL DE GLICOSILAÇÃO

Como já mencionado anteriormente, as linhagens CHO PRO⁵ e CHO LEC 1.3 são mutantes em algumas enzimas do processo de glicosilação e, portanto, a glucocerebrosidase produzida por essas células deve apresentar um padrão de oligossacarídeos diferente daquele apresentado pelas linhagens CHO.K1 e CHO Flp-InTM.

A eletroforese é uma técnica de separação de proteínas que consiste na migração de moléculas com carga numa solução, em função da aplicação de um campo elétrico. A velocidade da migração depende da força do campo aplicado, da carga, do tamanho e da forma das moléculas. O objetivo da utilização de um detergente, como o SDS, é desnaturar as proteínas, isto é, fazer com que as cadeias polipeptídicas percam as suas estruturas terciárias. Assim, as proteínas são convertidas a uma estrutura linear, com uma densidade de carga uniforme. Dessa forma, pela técnica de SDS-PAGE, elas são separadas somente em função da sua massa molar.

Se as proteínas desnaturadas são submetidas a um campo elétrico, todas elas se moverão para o pólo positivo na mesma proporção. Portanto é necessário colocá-las em um ambiente que permita uma velocidade de migração proporcional à sua massa molar, razão pela qual são utilizados

géis de poliacrilamida.

Foram preparados dois géis de poliacrilamida, cada um contendo amostras de sobrenadante de dois clones de cada uma das linhagens selecionadas neste trabalho. Após a corrida, um dos géis foi transferido para uma membrana, para a realização de um *Western-blot* (Figura 51A) e o outro foi corado com prata (Figura 51B).

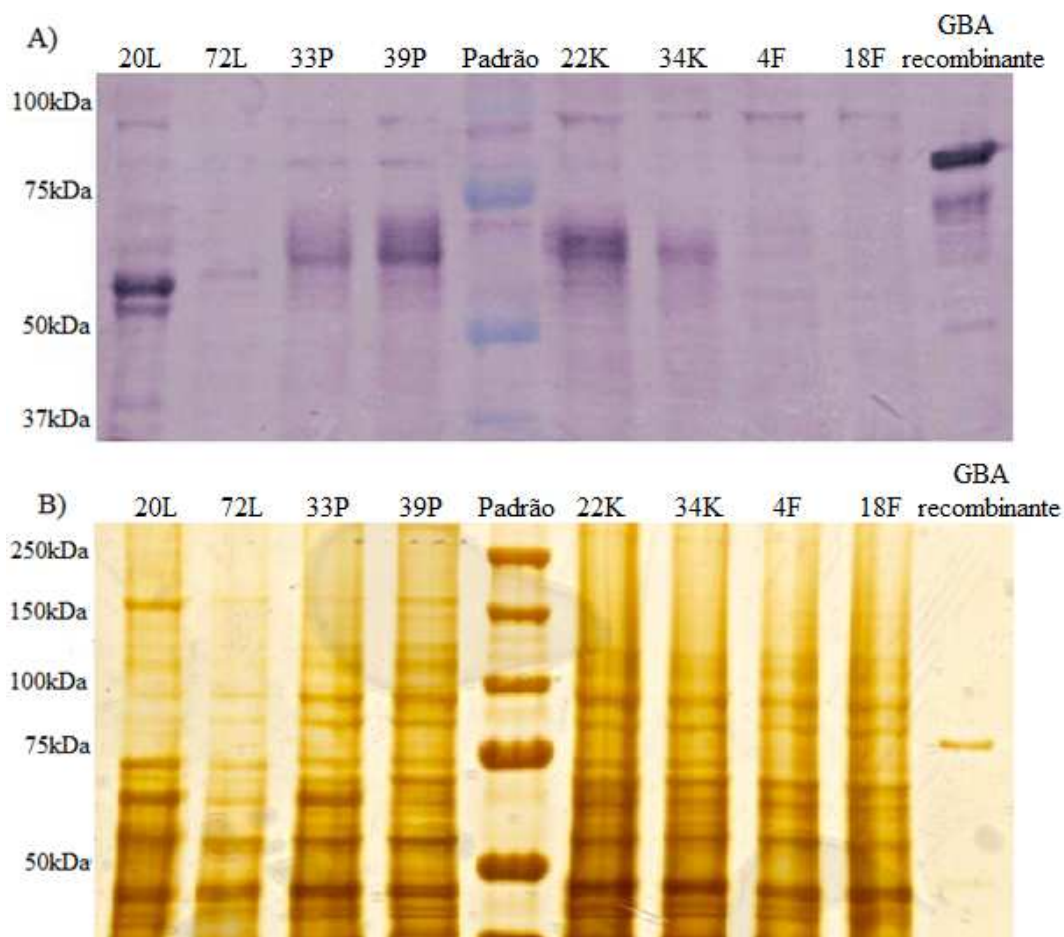


Figura 51: Análise por *Western-blot* (A) e SDS-PAGE (B) da β -glucocerebrosidase obtida no sobrenadante dos diferentes clones celulares. Padrão de tamanho de proteínas (Precision Plus Prestained Standards – All Blue, Bio-Rad) e GBA recombinante, marcada com GST, gerando um total de 84 kDa (Abnova).

Assim como esperado, as bandas provenientes dos clones de CHO LEC 1.3 são aquelas que apresentam menor massa molar. Essas células são deficientes na enzima *N*-acetil glicosamina transferase-1 (GlcNAcT-1), que é a primeira enzima que atua na via da *N*-glicosilação do complexo de Golgi. A estrutura de *N*-glicanos nas proteínas geradas por essas células sofrem a ação das enzimas α -1,2 glicosidases I, II e III e da α -manosidase I.

Quando a proteína passa do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, ocorre a perda de 3 manoses, gerando um oligossacarídeo com 5 manoses. Como as etapas de modificação dos *N*-glicanos não podem ser continuadas, devido à deficiência da enzima GlcNAcT-1, o processo de modificação dos açúcares nessas células termina nesse ponto.

Na Figura 51A, podem ser facilmente observadas duas bandas de tamanho bem próximo e bem definidas na raia 1. Estas correspondem às duas formas da glucocerebrosidase que são secretadas por essas células. A menor destas corresponde às proteínas que chegaram a ingressar no complexo de Golgi e, portanto, apresentam 5 manoses. Já a banda de maior massa molar corresponde às proteínas que não chegaram a ser processadas no complexo de Golgi e foram secretadas contendo 8 resíduos de manose, conforme representado na Figura 52.

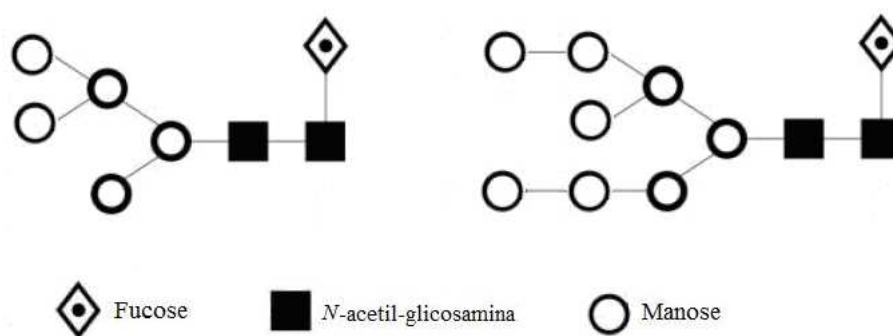


Figura 52: Representação das estruturas de *N*-glicanos provavelmente presentes nas glicofomas de β -glucocerebrosidase produzida pelo clone derivado da linhagem CHO LEC1.3, com 5 e 8 resíduos de manose.

As glicofomas geradas por essas células apresentam resíduos de manose expostos, que são essenciais para a atividade da glucocerebrosidase *in vivo*. Isso ocorre devido à presença de receptores de manose na membrana de macrófagos (CD206). Assim, através da exposição desses resíduos, as moléculas de GBA são facilmente captadas pelas células alvo, fazendo com que cheguem ao seu local de ação, o lisossoma.

Um estudo realizado pela empresa Genzyme, comparando o produto Cerezyme® à glucocerebrosidase produzida por células de inseto, leveduras e CHO LEC mutantes, concluiu que a cinética de ligação ao receptor de manose presente nos macrófagos foi bastante similar para todas as glicofomas da proteína. Isso indica que o aumento de três resíduos de manose presentes no Cerezyme® para nove resíduos de manose presentes na GBA produzida por células de inseto não leva a um aumento significativo no reconhecimento e na ligação aos receptores (Van Patten *et al.*, 2007).

Brumshtein *et al.* (2010) analisaram a velaglucerase alfa (glucocerebrosidase humana produzida em uma linhagem humana bem caracterizada através da ativação do gene endógeno da GBA, utilizando o sistema Gene-activatedTM). Ao meio de cultivo dessas células, foi adicionada kifunesina, um inibidor da manosidase-I, para obtenção da glucocerebrosidase com resíduos expostos de manose. Os glicanos gerados continham nove resíduos de manose e, segundo esse estudo, a GBA assim obtida (velaglucerase alfa) apresentou uma melhor cinética de captação do que o Cerezyme®.

Por outro lado, quando o número de resíduos de manose aumenta, a ligação com a MBL plasmática (proteína relacionada ao sistema imune) presente no soro também aumenta. Isto poderia representar uma maior resposta imunológica relacionada às estruturas contendo muitos resíduos de manose. De acordo com a literatura a glucocerebrosidase produzida pela mutante LEC foi capaz de se ligar aos receptores dos macrófagos e ser captada por eles e, ao mesmo tempo, não apresentar muita afinidade pela MBL, o que indica pouca imunogenicidade (Van Patten *et al.*, 2007).

Sendo assim, a glucocerebrosidase obtida nesse trabalho pelo clone 20L poderia ser utilizada para fins terapêuticos, sem a necessidade de um tratamento enzimático para exposição dos resíduos de manose através da remoção dos demais glicanos e nem a adição de inibidores das enzimas responsáveis pela maquinaria de glicosilação da célula ao meio de cultivo.

Já quando se analisam as bandas presentes nos sobrenadantes dos clones derivados da linhagem celular CHO PRO5, observam-se bandas que correspondem a proteínas de massa molar bem superior à encontrada no clone 20L e ligeiramente inferior à encontrada nos clones derivados da CHO.K1. No entanto, estas bandas (raias 3 e 4) diferentemente das bandas presentes na raia 1, são difusas, representando uma faixa de massas molares. Isso ocorre por conta da microheterogeneidade, ou seja, pela mistura de diferentes glicofomas.

A linhagem celular CHO PRO5 não expressa o gene $\beta 4GalT-6$, que codifica a β -4-galactosil-transferase-6. Apesar da falta dessa enzima, as outras galactosil transferases presentes na célula conseguem compensá-la, fazendo com que o perfil de galactosilação dos N-glicanos oriundos dessas células não seja alterado. Entretanto, há uma diminuição da presença de resíduos de ácidos siálicos na extremidade das antenas (Lee *et al.*, 2001).

Sendo assim, as prováveis estruturas presentes nas bandas das raias 3 e 4 incluem proteínas cujos glicanos são totalmente sialilados, parcialmente sialilados e aqueles que não possuem resíduos de ácido siálico em suas estruturas. Estas estruturas estão representadas na Figura 53.

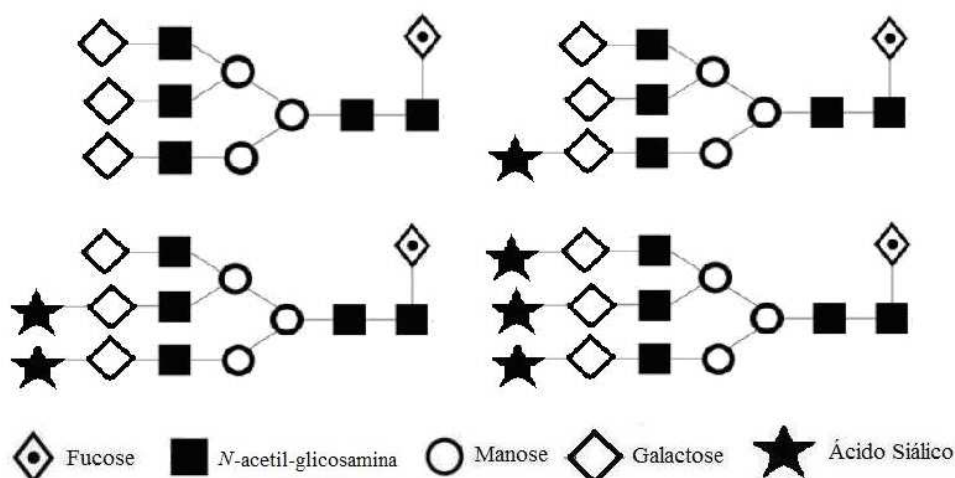


Figura 53: Representação das estruturas de N-glicanos provavelmente presentes na β -glucocerebrosidase produzida pelos clones derivados da linhagem CHO PRO5, sem resíduos de ácido siálico, parcialmente sialiladas e totalmente sialiladas.

Já as linhagens celulares CHO.K1 e CHO Flp-InTM não apresentam mutações nas enzimas relacionadas à modificação de oligossacarídeos. O padrão de *N*-glicosilação normalmente encontrado na β -glucocerebrosidase produzida em células CHO são oligossacarídeos complexos do tipo triantenário (Brumshtein *et al.*, 2010).

Na Figura 51A só é possível observar as bandas correspondentes às proteínas presentes nos sobrenadantes dos clones gerados a partir da linhagem CHO.K1, pois a baixa expressão dos clones derivados das células CHO Flp-InTM não permite a sua visualização. Nas raias 6 e 7, podem-se observar que as bandas também são difusas, porém menos difusas do que as presentes nas raias 3 e 4. Isto indica que há uma menor variedade de glicofomas presentes no sobrenadante desses clones. Sendo assim, as glicofomas que provavelmente se encontram nos sobrenadantes dessas células são aquelas parcialmente ou completamente sialiladas e, como as que estão ilustradas na Figura 54.

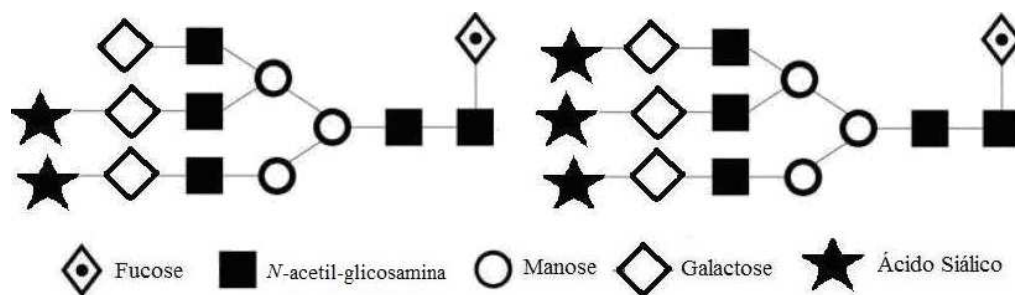


Figura 54: Representação das estruturas de *N*-glicanos provavelmente presentes na β -glucocerebrosidase produzida pelos clones derivados da linhagem CHO.K1, em sua maioria completamente sialilados.

Através das análises realizadas, é possível inferir que os clones 20L, 33P, 39P, 22K e 34K, ou seja, todos os que tiveram a GBA visualizada através de *Western-blot*, são capazes de produzir a glucocerebrosidase contendo o núcleo central (*core*) oligossacarídico. Isto é muito importante, uma vez que a conformação ativa da enzima é dependente da adição de oligossacarídeos ao primeiro sítio de *N*-glicosilação da proteína, localizado no resíduo de Asn19 (Berg-Fussmann *et al.*, 1993).

4.8 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO COM A SEQUÊNCIA DE KOZAK

Como foi detectado, através de sequenciamento de DNA, que a sequência de Kozak prévia ao ATG do gene da GBA havia sido perdida, novos primers foram sintetizados. Assim como realizado na etapa inicial, o cDNA da β -glucocerebrosidase foi obtido por reação de PCR, utilizando a mesma sequência molde (cDNA obtido da empresa Origene). A sequência foi amplificada utilizando os novos *primers* GBA_F e GBA_R, adotando a temperatura de anelamento estabelecida anteriormente em 57 °C. O produto gerado pela reação de PCR (Figura 55), de 1,6 kb, foi clonado no vetor de clonagem pCR2.1.

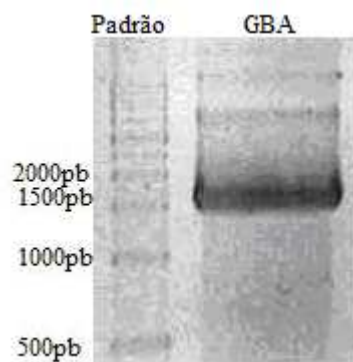


Figura 55: Amplificação do cDNA da GBA. A) Amplificação do cDNA da GBA para clonagem no vetor de clonagem. Padrão de tamanho de fragmento 1kb (LGC Biotecnologia).

O produto de ligação do fragmento amplificado ao vetor pCR2.1 foi usado na transformação de bactérias quimicamente competentes. As bactérias resistentes à ampicilina, que apresentaram coloração branca, foram analisadas por PCR de colônia, utilizando *primers* do vetor (M13F e M13R). O resultado desse PCR de colônia se encontra na Figura 56.

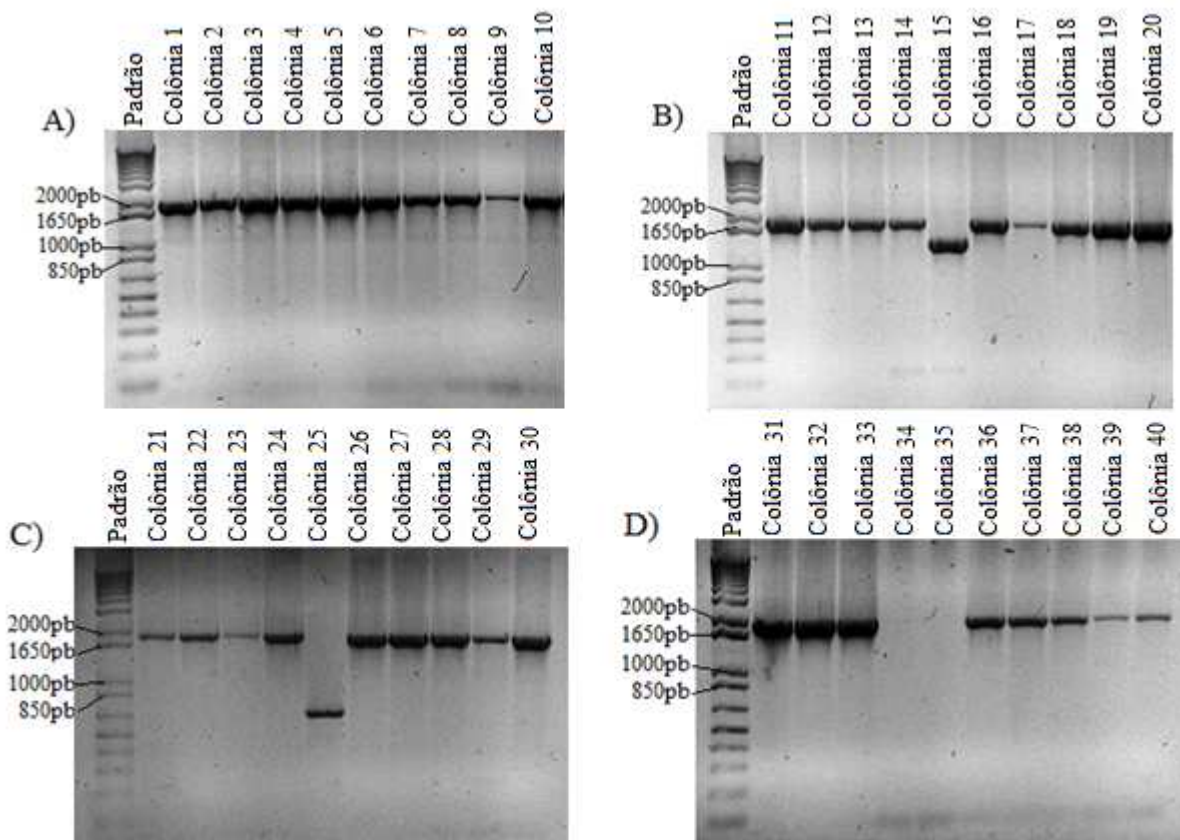


Figura 56: PCR de colônia para detectar as colônias que continham o vetor pCR2.1 com o inserto da GBA, realizado com os *primers* M13F e M13R. A) Padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen). Colônias obtidas pela transformação da ligação do pCR2.1 ao cDNA amplificado da GBA. B) Padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen). Colônias obtidas pela transformação da ligação do pCR2.1 ao cDNA amplificado da GBA. C) Padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen). Colônias obtidas pela transformação da ligação do pCR2.1 ao cDNA amplificado da GBA; D) Padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen). Colônias obtidas pela transformação da ligação do pCR2.1 ao cDNA amplificado da GBA.

As únicas colônias analisadas que não foram positivas para a presença do inserto foram as colônias 15, 25, 34 e 35. Todas as demais colônias amplificaram uma banda na altura correta, em torno de 1,8kb, relativa ao tamanho da GBA (1,6kb) mais 200 pb da região do vetor, à qual os *primers* M13F e M13R se anelam.

As colônias 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 19, 20, 28, 30 e 31 foram propagadas em meio seletivo e foi realizada a extração plasmidial dos caldos obtidos. Os plasmídeos foram analisados, por dupla digestão, com as enzimas de restrição *NheI* e *XhoI* que reconheciam os sítios presentes nos *primers* GBA_F e GBA_R, respectivamente. Contudo, nenhuma das digestões liberou o inserto da GBA, causando apenas a linearização do vetor.

Mais colônias foram propagadas em meio contendo ampicilina, desta vez as colônias 1, 4, 5, 11, 12, 18, 22, 23, 24, 26, 32, 33, 36, 37, 38 e 39. Após a extração plasmidial, as colônias foram submetidas à dupla digestão com as enzimas de restrição *NheI* e *XhoI*, conforme apresentado na Figura 57.

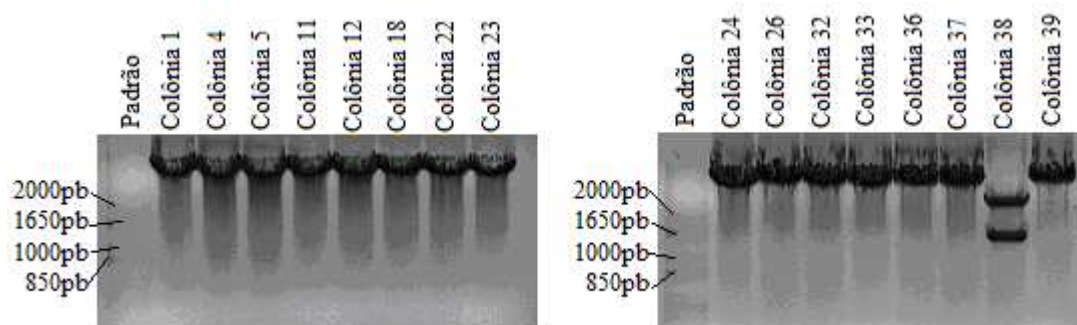


Figura 57: Digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição *NheI* e *XhoI*. Padrões utilizados: padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen).

Como, das 40 colônias inicialmente analisadas, apenas uma (a colônia 38) delas parecia possuir os *primers* com a sequência das enzimas de restrição corretas, foi utilizada uma nova estratégia. Três colônias (7, 14 e 30) foram digeridas separadamente com a enzima de restrição *EcoRI*, que flanqueia o local de ligação do inserto ao pCR2.1, para verificar se a GBA foi corretamente inserida, e com a enzima *NheI*, para verificar se a sequência presente no *primer* GBA_F está correta, o que provavelmente indicaria que a sequência de Kozak também poderia estar corretamente inserida.

A Figura 58 apresenta o esquema do sítio múltiplo de clonagem do vetor pCR2.1 contendo a sequência da GBA, como o produto de PCR, com destaque para os sítios de restrição.

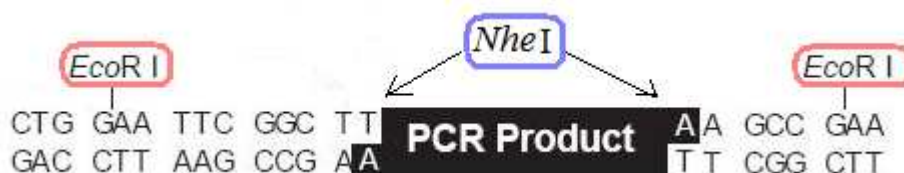


Figura 58: Visão detalhada do sítio múltiplo de clonagem do pCR2.1. Em rosa estão destacados os sítios da enzima de restrição *EcoRI* que flanqueia o local de ligação do inserto no vetor de clonagem. Em azul está destacado o sítio de restrição da enzima *NheI*, presente no *primer* GBA_F, e que, portanto, pode estar em qualquer uma das extremidades, dependendo de como ocorreu a ligação.

A colônia 38, selecionada anteriormente como sendo a única que libera o inserto ao ser digerida com as enzimas *NheI* e *XhoI* também, foi submetida a uma nova dupla digestão e digestões com cada uma dessas enzimas separadamente. Esta digestão, juntamente com a digestão das colônias 7, 14 e 30 digeridas separadamente com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NheI* estão mostradas na Figura 59.

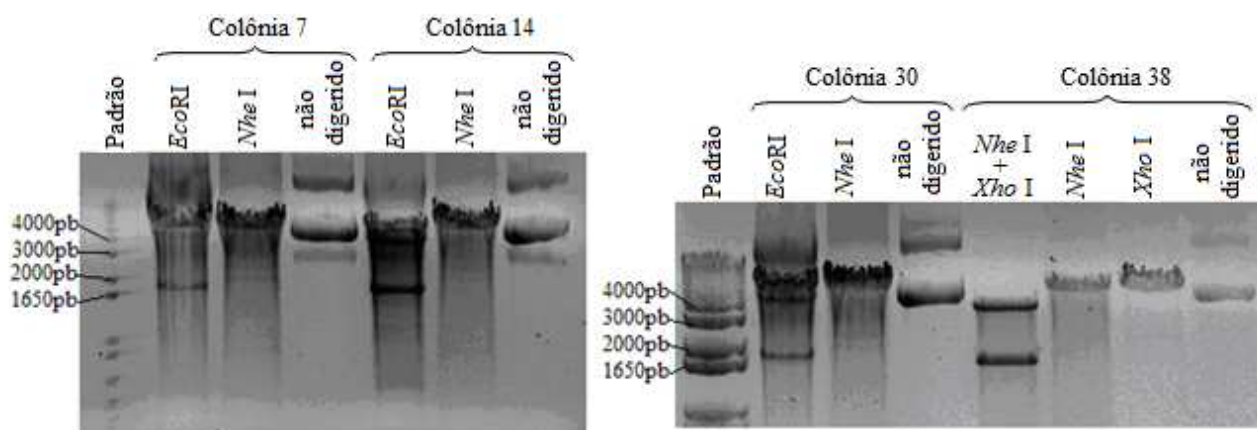


Figura 59: Digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição *EcoRI*, *NheI* e *XhoI*. Padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen).

As colônias 7, 14 e 30 liberaram o inserto da GBA, quando digeridas pela enzima de restrição *EcoRI*. Quando digeridas com a enzima *NheI*, aparentemente o vetor de clonagem é linearizado, o que indica que a sequência do *primer* GBA_F deve estar correta, pois o sítio de restrição dessa enzima não se encontra presente no sítio múltiplo de clonagem do vetor de clonagem.

O plasmídeo presente na colônia 38 também se lineariza com a digestão pela enzima *NheI*, também indicando que a sequência do *primer* GBA_F deve estar correta. O vetor também é linearizado pela digestão com a enzima *XhoI*, cujo sítio também está presente no vetor de clonagem, o que indica que a sequência presente no *primer* GBA_R não está correta ou que o *primer* GBA_R está ligado à extremidade do vetor que possui a sequência de restrição para essa enzima, ou seja, o oposto da orientação representada na Figura 21.

As colônias 14 e 38 foram enviadas para seqüenciamento. As análises do seqüenciamento das duas colônias mostraram que ambas as colônias apresentavam a seqüência correta tanto do *primer* GBA_F, contendo o sítio da enzima de restrição *Nhe*I e a seqüência de Kozak, quanto do cDNA da GBA. Já a seqüência do *primer* GBA_R estava correta na colônia 38 e alterada na colônia 14, fazendo com que não houvesse nem o sítio da enzima de restrição *Xho*I e nem da *Eco*RI.

Sendo assim, a colônia 38 foi escolhida para prosseguimento da clonagem. As enzimas *Nhe*I e *Xho*I foram utilizadas para digerir o vetor de clonagem presente na colônia 38, liberando o cDNA da GBA, e os vetores de expressão pcDNA3.1 e pcDNA5/FRT (Figura 60).

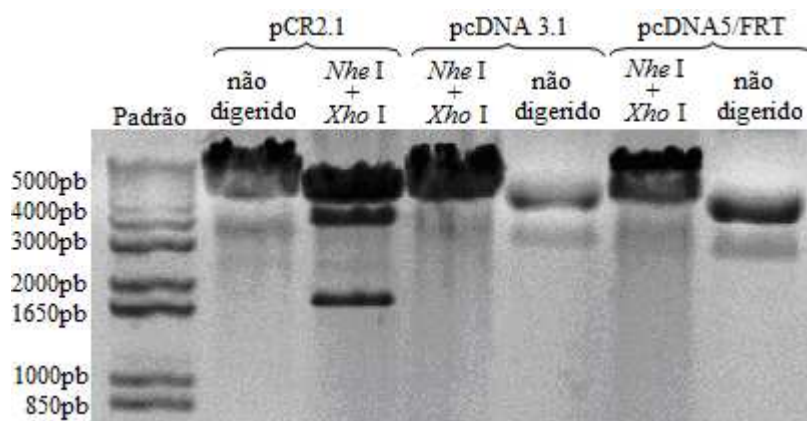


Figura 60: Dupla digestão dos vetores pCR2.1 (contendo o gene da GBA), pcDNA3.1 e pDNA5/FRT com as enzimas de restrição *Nhe*I e *Xho*I. Padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen).

O produto de ligação do fragmento retirado do vetor pCR2.1 aos vetores de expressão foi usado na transformação de bactérias competentes. As bactérias resistentes à ampicilina foram analisadas por PCR de colônia, utilizando os *primers* T7 e BGHR, que se anelam a sítos que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem dos vetores de expressão, conforme mostrado na Figura 61.

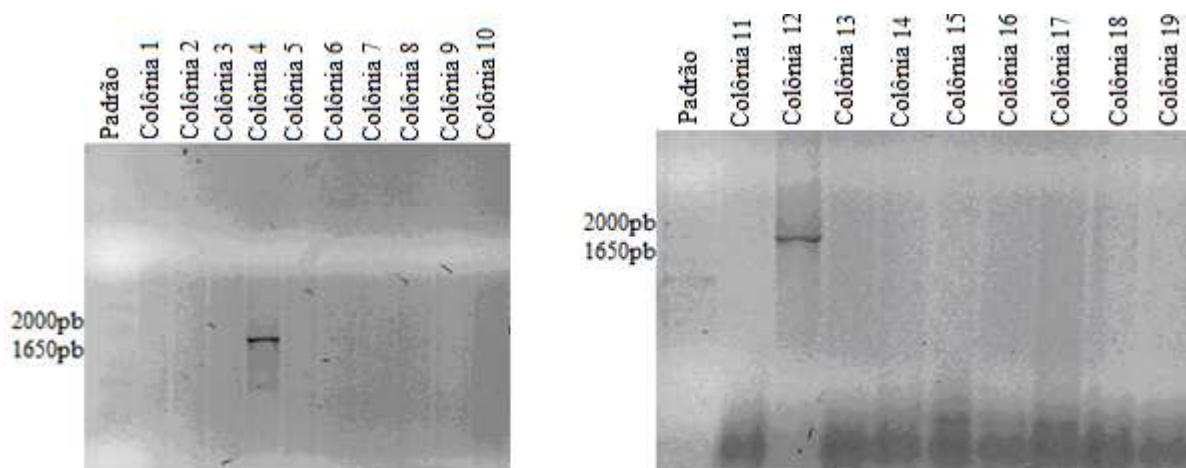


Figura 61: PCR de colônia para verificação do inserto no vetor pcDNA 3.1. Colônias obtidas pela ligação do vetor pcDNA3.1 com o cDNA da GBA contendo a seqüência de Kozak. Padrão de tamanho de fragmento 1kb plus (Invitrogen).

As colônias 4 e 12 pareceram conter o inserto do tamanho correto. Para confirmação, estas colônias foram submetidas a uma dupla digestão com as enzimas *Nhe*I e *Xho*I. Já a ligação do vetor pcDNA5/FRT com o cDNA da GBA não resultou em nenhuma colônia positiva no PCR de colônia. Para a realização de uma nova clonagem, mais uma digestão do pCR2.1 e do pcDNA5/FRT com as enzimas *Nhe*I e *Xho*I foi feita, conforme mostrado na Figura 62.

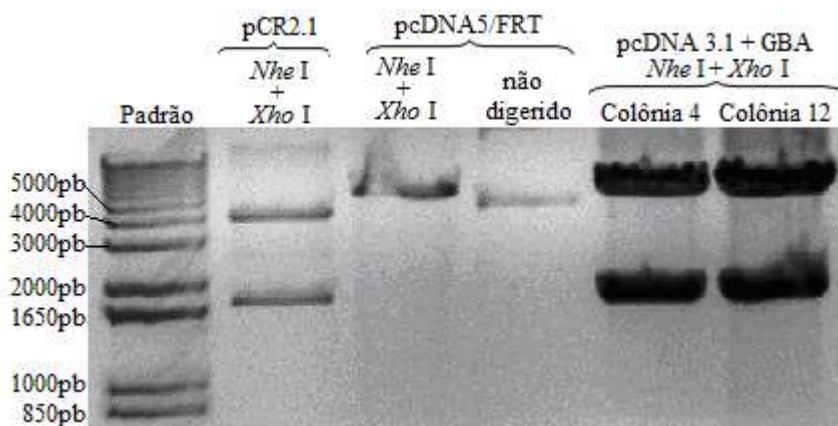


Figura 62: Digestão dos vetores pCR2.1 e pcDNA5/FRT para a clonagem e do vetor pcDNA 3.1 contendo o gene da GBA com a sequência de Kozak para a verificação do inserto. Padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen).

O produto de ligação do fragmento retirado do vetor pCR2.1 ao vetor pcDNA5/FRT foi usado na transformação de bactérias quimicamente competentes. As bactérias resistentes à ampicilina foram analisadas por PCR de colônia, utilizando os *primers* T7 e BGHR, conforme ilustrado na Figura 63.

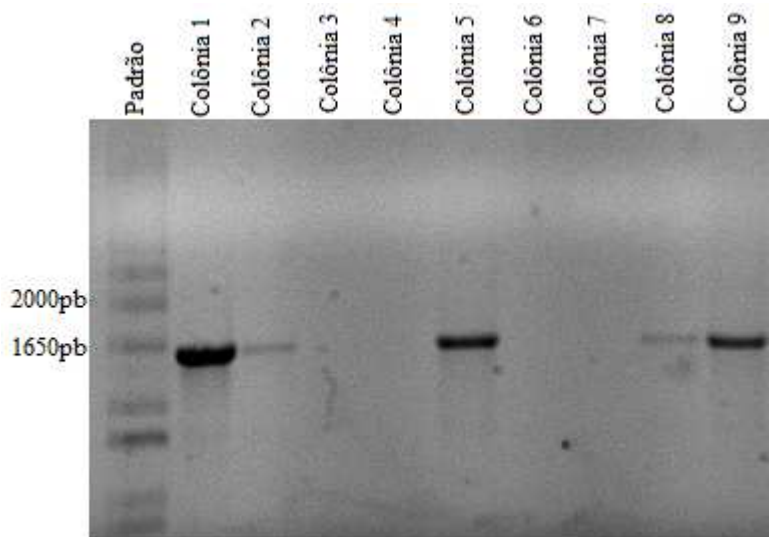


Figura 63: PCR de colônia para verificação do inserto no vetor pcDNA5/FRT. Colônias obtidas pela ligação do vetor pcDNA5/FRT com o cDNA da GBA contendo a sequência de Kozak. Padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen).

As colônias 1, 2, 5, 8 e 9 pareceram conter o inserto do tamanho correto. Para a confirmação

da inserção correta da GBA no pcDNA5/FRT, a colônia foi propagada e o produto de extração plasmidial digerido com as enzimas de restrição *Nhe*I e *Xho*I, conforme mostrado na Figura 64.

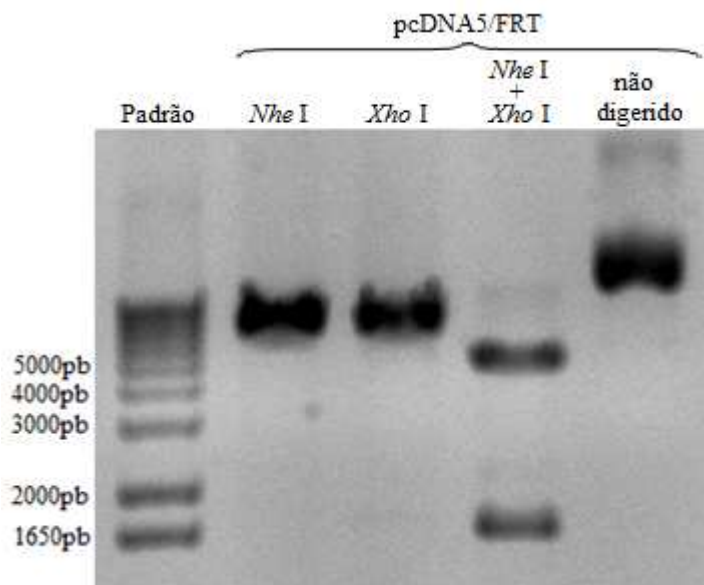


Figura 64: Digestão do vetor pcDNA5/FRT com o cDNA da GBA contendo a sequência de Kozak. Padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen).

4.9 INFLUÊNCIA DA SEQUÊNCIA DE KOZAK NA EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE GBA

Uma vez que todos os vetores de expressão estavam aparentemente prontos, os vetores pcDNA3.1 e pcDNA5/FRT com e sem a sequência de Kozak, foram testados comparativamente, em ensaio de transfecção transiente. A expressão transiente é um método utilizado para testar a funcionalidade e a integridade dos vetores de expressão de maneira rápida. Como nela o vetor não se integra ao cromossoma da célula hospedeira, os indesejáveis efeitos de posição não interferem na expressão do gene de interesse (Bollati-Fogolín & Comini, 2008).

Com esse objetivo, foram realizadas transfecções transientes de células CHO.K1 com os vetores pcDNA3.1 com e sem a sequência de Kozak e de células CHO Flp-In™ com os vetores pcDNA5/FRT com e sem a sequência de Kozak. Essas transfecções foram realizadas em triplicata.

O sobrenadante dos cultivos foi submetido a uma análise por imuno-*blot* para a verificação da produção da β -glucocerebrosidase e as células foram recolhidas para análises de expressão por PCR em tempo real.

A análise das transfecções transientes por imuno-*blot* se encontra na Figura 65.

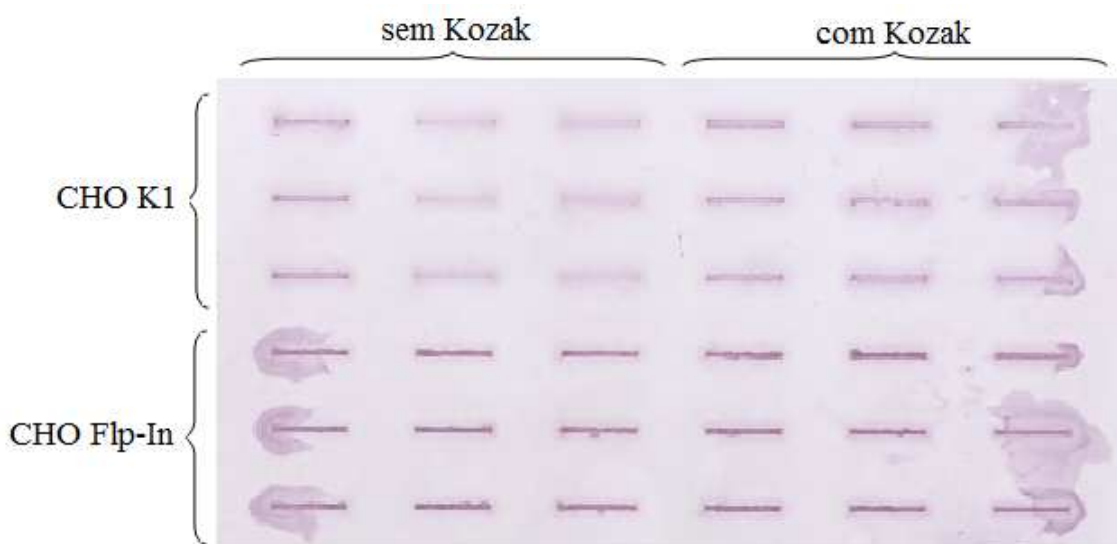


Figura 65: Análise por imuno-*blot* das transfecções transientes com os vetores pcDNA 3.1 e pcDNA5/FRT nas linhagens CHO.K1 e CHO Flp-InTM com e sem a sequência de Kozak.

A fácil visualização das bandas presentes em todas as transfecções indica que todos os vetores construídos são funcionais e capazes de expressar a proteína de interesse. Foi realizada uma comparação entre a intensidade das bandas obtidas a partir dos sobrenadantes das células transfectadas com a sequência da GBA sem a sequência de Kozak no primeiro ATG e com a sequência de Kozak no primeiro ATG. Essa análise foi realizada com o auxílio do programa ImageQuant5.2 e se encontra na Figura 66.

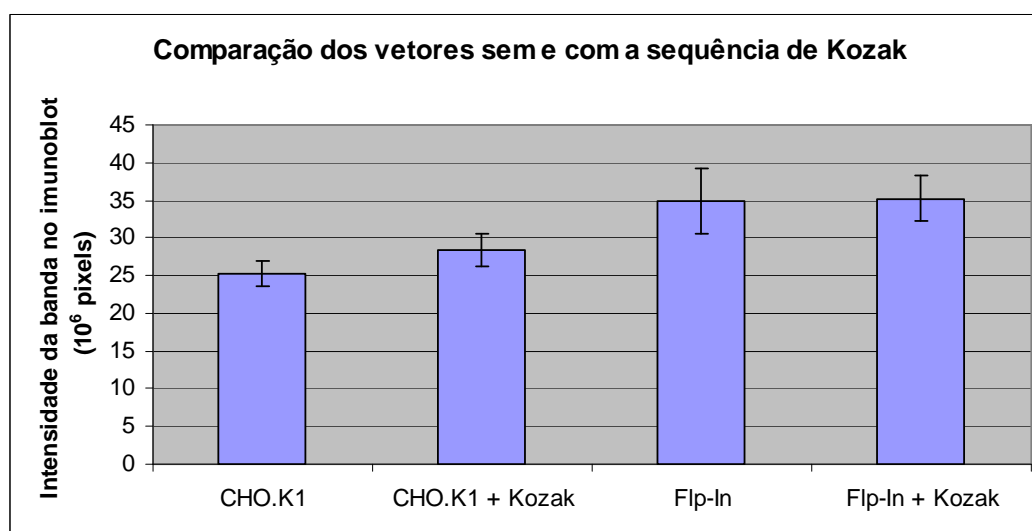


Figura 66: Comparação entre a intensidade média das bandas obtidas no ensaio de imuno-*blot* mostrado na Figura 65.

Pode-se observar que a intensidade das bandas obtidas no imuno-*blot* para as transfecções com vetor pcDNA3.1 em células CHO.K1 foi um pouco maior quando este possuía a sequência de Kozak no primeiro ATG. Já no vetor pcDNA5/FRT, não houve diferença significativa entre as duas

construções.

As análises de PCR em tempo real foram realizadas utilizando as transfecções sem a sequência de Kozak como controle para as transfecções onde o vetor continha a sequência de Kozak. As curvas padrão para cálculo de eficiência dos *primers* estão apresentadas anteriormente, na Figura 44 para a análise da CHO.K1 e na Figura 48 para a análise da CHO Flp-InTM. Os resultados desta análise da expressão relativa da GBA, por PCR em tempo real, estão mostrados na Figura 67.

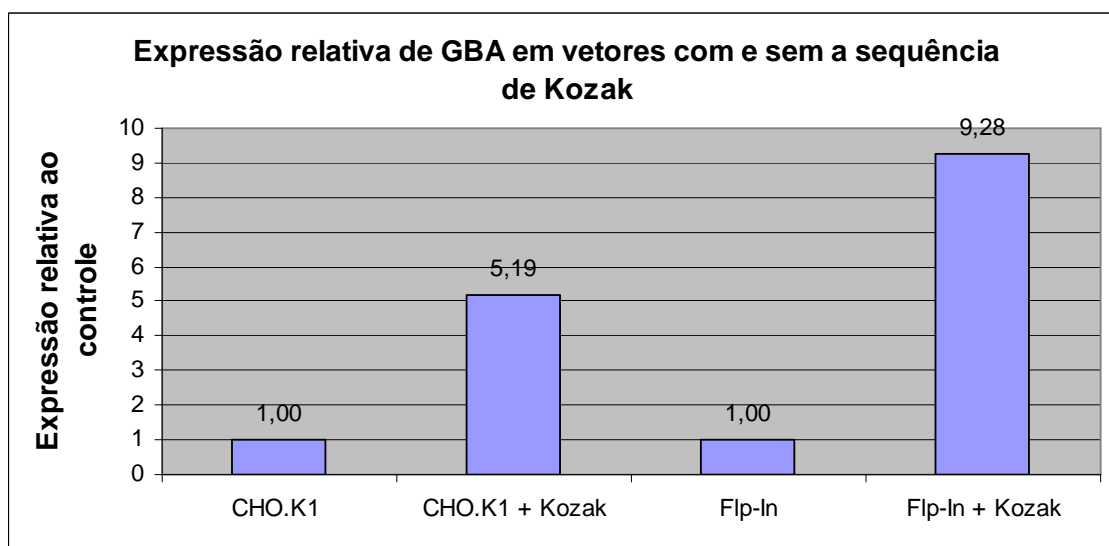


Figura 67: Análise de expressão relativa por PCR em tempo real das transfecções realizadas com os vetores contendo a sequência de Kozak em relação às transfecções com os vetores sem a sequência de Kozak.

De acordo com a Figura 67, a expressão da GBA pelas células CHO.K1 foi cinco vezes maior quando o vetor utilizado possuía a sequência de Kozak. Já nas células CHO Flp-InTM, esse aumento foi ainda maior. As células CHO Flp-InTM transfectadas com o vetor contendo a sequência de Kozak expressaram nove vezes mais o gene de interesse do que aquelas transfectadas com o vetor sem essa sequência.

As análises das transfecções transientes obtiveram resultados muito similares àqueles observados para os clones selecionados neste trabalho, nos quais o aumento de RNAm não levou a um aumento correspondente na quantidade de proteína presente no sobrenadante das culturas. Isto provavelmente se deve à presença da proteína constitutiva de controle traducional, que se liga à fita dupla de RNAm da glucocerebrosidase (Xu & Grabowski, 1998).

Com base nestes dados, esses estudos preliminares apontam a importância da presença da sequência de Kozak no primeiro ATG funcional do cDNA da glucocerebrosidase para um aumento de expressão da mesma.

4.10 ANÁLISE DA BAIXA PRODUÇÃO DE GBA POR CLONES OBTIDOS A PARTIR DO SISTEMA DE INTEGRAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA

A expressão de GBA pelos clones estáveis derivados da linhagem celular CHO Flp-In™ transfectada com o gene da GBA foi menor do que a esperada para um sistema de integração sítio-dirigida. Portanto, decidiu-se averiguar se, de fato, a recombinação entre os sítios FRT ocorreu.

O cDNA, sintetizado a partir do RNAm extraído dos clones da CHO Flp-In™, foi utilizado para realizar um PCR com *primers* específicos para o gene da higromicina (Figura 68). Esse gene só poderá ser expresso pelas células nas quais ocorreu a recombinação, pois no vetor pcDNA5/FRT o gene da higromicina não possui nem um promotor e nem o ATG inicial. A recombinação entre o gene que confere resistência à zeocina, na linhagem CHO Flp-In™ não transfectada, e o gene da higromicina, presente no vetor pcDNA5/FRT, é indispensável para que gene de resistência à higromicina possa ser expresso.

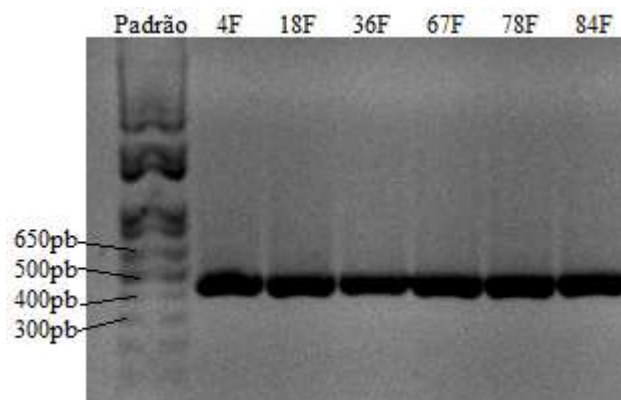


Figura 68: PCR para detecção da expressão do gene que confere resistência higromicina nos clones derivados de CHO Flp-In™. Padrão de tamanho de fragmento 1kb Plus (Invitrogen).

Apesar do controle negativo da reação de PCR ter apresentado uma banda na mesma altura da banda do gene da higromicina, pode-se observar que a intensidade desta é muito inferior à apresentada pelo controle positivo e pelos clones. Esse resultado indica que, de fato, os clones da CHO Flp-In™ são capazes de expressar o gene de resistência à higromicina e que, portanto, a reação de recombinação entre os sítios FRT ocorreu. Sendo assim, este, provavelmente, não é o motivo da baixa expressão da GBA nos clones derivados dessa linhagem.

Com base na literatura, buscou-se encontrar outras possíveis causas para a baixa expressão em clones estáveis de CHO Flp-In™. De acordo com Yew (2005), o promotor CMV alcança expressão máxima de 1 a 2 dias após a transfecção, seguido de um declínio da sua atividade pelo período de 1 a 2 semanas. A razão pela qual ocorre essa inativação ainda não é clara. As possíveis explicações seriam a inibição por citocinas, a inativação pela ligação de uma proteína repressora e pela metilação do DNA.

Modificações epigenéticas são alterações presentes no DNA que não envolvem a alteração da sua sequência. Alguns exemplos são a metilação do DNA e a acetilação de histonas. O DNA pode ser metilados nos resíduos de citosina dos dinucleotídeos CpG por enzimas denominadas DNA metiltransferases e as histonas podem ser acetiladas nos seus resíduos de lisina pelas histona acetiltransferases. O papel chave das modificações epigenéticas é o controle da expressão gênica, fazendo com que as sequências sofram repressão transcricional por criar uma estrutura repressiva na cromatina (Prokhortchouk & Defossez, 2008).

Apesar de não haver nenhum relato sobre a perda de expressão da proteína de interesse diretamente associada à utilização da linhagem celular CHO Flp-In™, a regulação negativa do promotor viral CMV (citomegalovírus) e a subsequente perda de expressão do gene de interesse foram reportadas quando o vetor pcDNA5/FRT foi utilizado nas linhagens celulares 3T3 Flp-In™ e BHK Flp-In™. Nessas células, é recomendável a utilização de outro vetor que tenha o promotor EF α 1 (fator de alongação) (Invitrogen Manuals, 2009a).

Em um trabalho publicado por Liu *et al.* (2006), foi observado o silenciamento gênico e, conseqüentemente, o fim da expressão do gene de interesse após a retirada da pressão seletiva com o antibiótico higromicina, em um sistema de integração sítio dirigida, utilizando o vetor pcDNA5/FRT. Os autores atribuem esse fenômeno a regulações epigenéticas negativas, causadas por acetilação de histonas e metilação do DNA, resultantes do ambiente do *locus* cromossômico no qual o vetor se encontra e dos componentes do vetor que carrega o gene de interesse.

Portanto, os fatores discutidos acima podem estar relacionados à menor expressão de GBA observada nos clones estáveis derivados da linhagem CHO Flp-In™ (expressão por integração sítio-dirigida) em relação aos clones estáveis derivados da linhagem CHO.K1 (expressão por integração aleatória). Cabe ressaltar que os fatores discutidos não teriam efeito em ensaios de expressão transiente, o que está em acordância com a maior expressão de GBA obtida na linhagem CHO Flp-In™ transfectada de forma transiente.

V- CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que os clones derivados das linhagens CHO.K1, CHO PRO 5 e CHO LEC 1.3, obtidos através de transfecção com o vetor de expressão pcDNA3.1 contendo o gene da GBA, são capazes de expressá-lo mesmo após a retirada da pressão seletiva do meio de cultivo.

Dentre os clones selecionados, alguns se destacaram pela capacidade de secretar a glucocerebrosidase ativa em quantidade satisfatória, tais como os clones 20L, 14P, 65P, 6K e 16K antigo.

A análise por PCR em tempo real de amostras de RNA extraídas de clones selecionados mostrou que não é possível a realização de uma correlação direta entre a maior expressão e a maior produção da glucocerebrosidase ativa. Isto, provavelmente, se deve à presença de uma proteína que regula a transcrição da glucocerebrosidase, se ligando ao seu RNAm.

Os clones utilizados para as análises por SDS-PAGE e *Western-blot* apresentaram bandas com massa molar condizente com o padrão de glicosilação esperado para as linhagens que os originaram. O clone 20L, produzia uma proteína aparentando possuir *N*-glicanos com resíduos manosilados, essenciais para a atividade *in vivo* da GBA.

A influência da sequência de Kozak no primeiro ATG funcional da glucocerebrosidase foi analisada em ensaios de expressão transiente por PCR em tempo real e por *imuno-blot*. Essas análises preliminares mostraram um grande aumento na expressão relativa da GBA, porém um pequeno aumento na produção (avaliada por *imuno-blot*), pelas células transfectadas com os vetores contendo a sequência de Kozak.

O sistema de integração sítio dirigida analisado nesse trabalho (sistema Flp-InTM da Invitrogen) não forneceu o resultado esperado, pois os clones selecionados a partir desta linhagem apresentaram atividade enzimática muito baixa. As bandas obtidas através de análise por *imuno-blot* também foram muito fracas, semelhantes ao controle não transfectado.

A integridade e funcionalidade do vetor de integração sítio-dirigida (pcDNA5/FRT) foram testadas através da realização de ensaios de transfecção transiente. Estes mostraram que a falta de expressão dos clones selecionados a partir da linhagem CHO Flp-InTM não se deve a problemas na construção do vetor de expressão.

Uma análise realizada com cDNA sintetizado a partir do RNAm extraído dos clones derivados da CHO Flp-InTM mostrou que estas células expressam o gene de resistência à higromicina, o que só pode ocorrer se a recombinação, que leva à integração sítio-dirigida do vetor

de expressão pcDNA5/FRT, tiver ocorrido.

Com base nisso, foi possível concluir que a baixa expressão do gene da GBA por clones derivados dessas células não está relacionada a erros nem na construção do vetor e nem na transfecção das células. A falha pode estar relacionada diretamente ao sistema de integração sítio-dirigida, uma vez que existem diversos trabalhos na literatura que relatam perda da expressão do gene de interesse após a retirada do antibiótico de seleção do meio de cultivo.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, sugere-se em trabalhos futuros:

✓ Desenvolver e padronizar uma metodologia para a quantificação da glucocerebrosidase secretada no meio de cultivo;

✓ Realizar ensaios de cinética de crescimento e produção da GBA para os melhores clones obtidos. Assim poderá ser analisado o perfil da produção da glucocerebrosidase pelas células recombinantes, para determinar se a mesma é mais produzida durante a fase de crescimento exponencial ou na fase estacionária (produção associada ou não-associada ao crescimento);

✓ Separar e seqüenciar os diferentes produtos obtidos na análise de PCR em tempo real para comprovar a existência de sítios de *splicing* críticos no RNAm da glucocerebrosidase;

✓ Analisar, por exemplo, por HPLC as glicofomas geradas pelos diferentes clones, para que sejam confirmadas e completamente caracterizadas as estruturas dos oligossacarídeos presentes na GBA recombinante produzida pelos diferentes clones;

✓ Avaliar a influência da sequência de Kozak no primeiro ATG da GBA, em termos de atividade enzimática. Se esta for positiva, realizar novas transfecções estáveis, com o objetivo de selecionar novos clones melhores produtores da glucocerebrosidase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B. H., März, L., 1999. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal*, v. 16, pp. 109–123.
- Anderson, C., 1991. "AIDSgate" - a chronology. *Nature*, v. 353, pp. 197.
- Ben-Dor, S., Esterman, N., Rubin, Eitan., Sharon, N., 2004. Biases and complex patterns in the residues flanking protein *N*-glycosylation sites. *Glycobiology*, v. 14 (2), pp. 95-101.
- Berg-Fussman, A., Grace, M. E., Ioannou, Y., Grabowski, G. A., 1993. Human beta-glucosidase: *N*-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268 (20), pp 14861-14866.
- Bergmann, J. E., Grabowski, G. A., 1989. Posttranslational processing of human lysosomal acid beta-glucosidase: A continuum of defects in Gaucher disease type 1 and type 2 fibroblasts. *American Journal of Human Genetics*, v. 44 (5), pp. 741-750.
- Bobrowicz, P., Davidson, R. C., Li, H., Potgieter, T. I., Nett, J. H., Hamilton, S. R., Stadheim, T. A., Miele R. G., Bobrowicz, B., Mitchell, T., Rausch, S., Renfer, E., Wildt, S., 2004. Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose. *Glycobiology*, v. 14 (9), pp. 757-766.
- Bollati-Fogolín, M. & Comini, M. A., 2008. "Clonagem e expressão de proteínas heterólogas em células animais". In: Moraes, A.M., Augusto, E.F.P. & Castilho, L.R., *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 1º ed., capítulo 3, São Paulo, SP, Editora Roca.
- Branda, C. S., Dymecki, S. M., 2004. Talking about a revolution: the impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Developmental Cell*, v. 6, pp. 7-28.
- Brumshtein, B., Salinas, P., Peterson, B., Chan, V., Silman, I., Sussman, J. L., Savickas, P. J., Robinson, G. S., Futerman, A. H., 2010. Characterization of gene-activated human acid-beta-glucosidase: Crystal structure, glycan composition, and internalization into macrophages.

Glycobiology, v. 20 (1), pp. 24-32.

Bukovac, S., Bagshaw, R. D., Rigat, B. A., Callahan, J. W., Clarke, J. T. R., Mahuran, D. J., 2008. Cryptic splice site in the complementary DNA of glucocerebrosidase causes inefficient expression. *Analytical Biochemistry*, v. 381, pp 276-278.

Burgess-Brown, N. A., Sharma, S., Sobott, F., Loenarz, C., Oppermann, U., Gileadi, O., 2008. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expression and Purification*, v. 59, pp. 94–102.

Butler, M., 2008, “Modificações pós-tradução em proteínas recombinantes”. In: Moraes, A.M., Augusto, E.F.P. & Castilho, L.R., *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 1º ed., capítulo 6, São Paulo, SP, Editora Roca.

Butters, T. D., 2007. Gaucher disease. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 11 (4), pp. 412-418.

Byrne, B., Donohoe, G. G., O’Kennedy, R., 2007. Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discovery Today*, v. 12 (7-8), pp. 319-326.

Cerezyme® - Monografia do produto, 2001. Disponível em: www.genzyme.com.br acessado em 11 de novembro de 2009.

Chen, W., Stanley, P., 2003. Five Lec1 CHO cell mutants have distinct *Mgat1* gene mutation that encode truncated *N*-acetylglucosaminyltransferase I. *Glycobiology*, v. 13 (1), pp. 43-50.

Chenua, S., Grégoire, A., Malykh, Y., Visvikis, A., Monaco, L., Shaw, L., Schauer, R., Marc, A., Goergen, J. L., 2003. Reduction of CMP-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase activity in engineered Chinese hamster ovary cells using an antisense-RNA strategy. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, v. 1622 (2), pp. 133– 144.

Cox, T., Lachmann, R., Hollak, C., Aerts, J., Van Weely, S., Hrebicek, M., Platt, F., Butters, T., Dwek, R., Moyses, C., Gow, I., Elstein, D., Zimran, A., 2000. Novel oral treatment of Gaucher's disease with *N*-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet*, v. 355 (9214), pp. 1481-1485.

- Daniels, L. B., Glew, R. H., 1982. β -glucosidase assay in the diagnosis of Gaucher's disease. *Clinical Chemistry*, v. 28 (4), pp. 569-577.
- Demain, A. L., Vaishnav, P., Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, 2009. *Biotechnology Advances*, v. 27 (3), pp. 297–306.
- Durocher, Y., Butler, M., 2009. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, pp. 700-707.
- Dwek, R.A., Butters, T.D., Platt, F. M., Zitzmann, N., 2002. Targeting glycosylation as a therapeutic approach. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1 (1), pp. 65-75.
- Elstein, Y., Eisenberg, V., Granovsky-Grisaru, S., Rabinowitz, R., Samueloff, A., Zimran, A., Elstein, D., 2004. Pregnancies in Gaucher disease: a 5-year study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 190 (2), pp. 435-441.
- Fabrega, S., Durand, P., Codogno, P., Bauvy, C., Delomenie, C., Henrissat, B., Martin, B. M., McKinney, C., Ginns, E. I., Mornon, J. P., Lehn, P., 2000. Human glucocerebrosidase: heterologous expression of active site mutants in murine null cells. *Glycobiology*, v. 10 (11), pp. 1217-1224.
- Gomord, V., Faye, L., 2004. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7 (2), pp. 171–181.
- Gouveia, R., Kandzia, S., Conradt, H. S., Costa, J., 2009. Production and *N*-glycosylation of recombinant human cell adhesion molecule L1 from insect cells using the stable expression system. Effect of dimethyl sulfoxide. *Journal of Biotechnology*, Article in press.
- Grabenhorst, E., Schlenke, P., Pohl, S., Nimtz, M., Conradt, H. S., 1999. Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconjugate Journal*, v. 16 (2), pp. 81–97.
- Grabowski, G. A., Horowitz, M., 1997. Gaucher's disease: Molecular, genetic and enzymological aspects, *Baillière's Clinical Haematology*, v. 10 (4), pp. 635-656.

- Grabowski, G. A., Leslie, N., Wenstrup, R., 1998. Enzyme therapy for Gaucher disease: The first 5 years. *Blood Reviews*, v. 12 (2), pp. 115-133.
- Grabowski, G. A., 2008. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *The Lancet*, v. 372 (9645), pp. 1263-1271.
- Grace, M.E., Berg, A., He, G.S., Goldberg, L., Horowitz, M., Grabowski, G. A., 1991. Gaucher disease: Heterologous expression of two alleles associated with neuronopathic phenotypes. *American Journal of Human Genetics*, v. 49 (3), pp. 646-655.
- Grace, M. E., Newman, K. M., Scheinker, V., Berg-Fussman, A., Grabowski, G. A., 1994. Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269 (3), pp. 2283-2291.
- Hacker, D. L., De Jesus, M., Wurm, F. M., 2009. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells — Where do we go from here?. *Biotechnology Advances*, v. 27 (6), pp. 1023-1027.
- Hershberg, R., Petrov, D. A., 2008. Selection on Codon Bias. *The Annual Review of Genetics*, v. 42, pp. 287-299.
- Hoppe, H., 2000. Recombinant glucocerebrosidase and Lyme disease vaccine Made by genetic engineering (No. 11 in a series of articles to promote a better understanding of the use of genetic engineering). *Journal of Biotechnology*, v. 76 (2-3), pp. 259-263.
- Hossler, P., Mulukutla, B. C., Hu, W. S., 2007. System analysis of *N*-glycan processing in mammalian cells. *PLoS ONE*, v. 2 (8), e713.
- Invitrogen Manuals, 2004. TA Cloning™ Kit. Disponível em: www.invitrogen.com, acessado em 11 de novembro de 2009.
- Invitrogen Manuals, 2009a. Flp-In™ System. Disponível em: www.invitrogen.com, acessado em 11 de novembro de 2009.

- Invitrogen Manuals, 2009b. pcDNA 3.1™ (+/-). Disponível em: www.invitrogen.com, acessado em 11 de novembro de 2009.
- Jonsson, L. M. V., Murray, G. J., Sorrell, S.H., 1987. Biosynthesis and maturation of glucocerebrosidase in Gaucher fibroblasts. *European Journal of Biochemistry*, v. 164 (1), pp. 171-179.
- Kanda, Y., Tamane-Ohnuki, N., Sakai, N., Yamano, K., Nakano, R., Inoue, M., Misaka, H., Iida, S., Wakitani, M., Konno, Y., Yano, K., Shitara, K., Hosoi, S., Satoh, M., 2006. Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 94 (4), pp. 680-688.
- Kattlove, H. E., Williams, J. C., Gaynor, E., Spivack, M., Bradley, R. M., Brady, R. O., 1969. Gaucher cells in chronic myelocytic leukemia: an acquired abnormality. *Blood*, v. 33 (2), pp. 379-390.
- Karg, S. R., Kallio, P. T., 2009. The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnology Advances*, v. 27 (6), pp. 879-894.
- Kind, A., Schnieke, A., 2008. Animal pharming, two decades on. *Transgenic Research*, 17 (6), pp. 1025-1033.
- Kozak, M., 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, v. 44 (2), pp. 283-292.
- Kozak, M., 2002. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, v. 299 (1-2), pp. 1-34.
- Královicová, J., Vorechovský, I., 2007. Global control of aberrant splice-site activation by auxiliary splicing sequences: evidence for a gradient in exon and intron definition. *Nucleic Acids Research*, v. 35 (19), pp 6399-6413.
- Lawrence, S. M., Huddleston, K. A., Tomiya, N., Nguyen, N., Lee, Y. C., Vann, W. F., Coleman, T. A., Betenbaugh, M. J., 2001. Cloning and expression of human sialic acid pathway genes to generate CMP-sialic acids in insect cells. *Glycoconjugate Journal*, v. 18 (3), pp. 205-213.

- Lawrence, S., 2007. Billion dollar babies — biotech drugs as blockbusters. *Nature Biotechnology*, v. 25, pp. 380–382.
- Ledford, H., 2006. The farmyard drug store. *Nature*, v. 443 (7107), pp. 16-17.
- Lee, J., Sundaram, S., Shaper, N. L., Raju, T. S., Stanley, P., 2001. Chinese hamster ovary (CHO) cells may express six β 4-Galactosyltransferases (β 4GalTs). Consequences of the loss of functional β 4GalT-1, β 4-GalT-6, or both in CHO glycosylation mutants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276 (18), pp. 13924-13934.
- Léo, P., Galesi, A. L. L., Suazo, C. A. T., Moraes, A. M., 2008. “Células animais: Conceitos Básicos”. In: Moraes, A.M., Augusto, E.F.P. & Castilho, L.R., *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 1º ed., capítulo 2, São Paulo, SP, Editora Roca.
- Leonova, T., Grabowski, G. A., 2000. Fate and sorting of acid β -glucosidase in transgenic mammalian cells. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 70 (4), pp. 281-294.
- Li, H., Sethuraman, N., Stadheim, T., Zha, D., Prinz, B., Ballew, N., Bobrowicz, P., Choi, B., Cook, W. J., Cukan, M., Houston-Cummings, N. R., Davidson, R., Gong, B., Hamilton, S. R., Hoopes, J. P., Jiang, Y., Kim, N., Mansfield, P., Nett, J. H., Rios, S., Strawbridge, R., Wildt, S., Gerngross, T. U., 2006. Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nature biotechnology*, v. 24 (2), pp. 210-215.
- Liu, W., Xiong, Y., Gossen, M., 2006. Stability and homogeneity of transgene expression in isogenic cells. *Journal of Molecular Medicine*, v. 84 (1), pp. 57-64.
- Lubertozzi, D., Keasling, J. D., 2009. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology Advances*, v. 27 (1), pp. 53–75.
- Makrides, S. C., 1999. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. *Protein Expression and Purification*, v. 17 (2), pp. 183-202;
- Ministério da Saúde, 2002. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – Doença de Gaucher. Portaria SAS/MS nº 449, de 08 de julho de 2002. Disponível em:

http://dtr2001.saude.gov.br/sas/dsra/protocolos/do_d11_01.pdf acessado em 11 de novembro de 2009.

Ministério da Saúde, 2007. Política Nacional de Assistência Farmacêutica. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dirceubarbanodafsciems.pdf> acessado em 11 de novembro de 2009.

Moharram, R., Maynard, D., Wang, E. S., Makusky, A., Murray, G. J., Martin, B. M., 2006. Reexamination of the cysteine residues in glucocerebrosidase. *FEBS Letters*, 580 (14), pp. 3391-3394.

New England Journal of Medicine, v. 325 (25), pp. 1809-1811, 1991.

Omasa, T, 2002. Gene amplification and its application in cell and tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94 (6), pp. 600-605;

Pasmanik-Chor, M., Elroy-Stein, O., Aerts, H., Agmon, V., Gatt, S., Horowitz, M., 1996. Overexpression of human glucocerebrosidase containing different-sized leaders. *Biochemistry Journal*, v. 317 (1), pp. 81-88.

Pastores, G. M., Meere, P. A., 2005. Musculoskeletal complications associated with lysosomal storage disorders: Gaucher disease and Hurler-Scheie syndrome (mucopolysaccharidosis type I). *Current Opinion in Rheumatology*, v. 17 (1), pp. 70-78.

Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, v. 29 (9), pp. e45.

Platt, F. M., Butters, T. D., 1998. New therapeutic prospects for the glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Biochemical Pharmacology*, v. 56 (4), pp 421-430.

Primrose, S. B., Twyman, R. M., 2006, "Basic Techniques". In: *Principles of gene manipulation and genomics*, 7^o ed., capítulo 2, Malden, Blackwell.

Prokhortchouk, E., Defossez, P. A., 2008. The cell biology of DNA methylation in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, v. 1783 (11), pp. 2167-2173.

- Qoronfleh, M. W., Hesterberg, L. K., Seefeldt, M. B., 2007. Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens. *Protein Expression and Purification*, v. 55 (2), pp. 209-224.
- Reczek, D., Schwake, M., Schroder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Patten, S. V., Edmunds, T., Saftig, P., 2007. LIMP-2 a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of β -glucocerebrosidase. *Cell*, v. 131 (4), pp. 770-783.
- Roca, X., Sachidanandam, R., Krainer, A. R., 2003. Intrinsic differences between authentic and cryptic 5' Splice sites. *Nucleic Acids Research*, v. 31 (21), pp. 6321-6333.
- Ron, I., Horowitz, M., 2005. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Human Molecular Genetics*, v. 14 (16), pp. 2387-2398.
- Rosenberg, M., Kingma, W., Fitzpatrick, M. A., Richards, S. M., 1999. Immunosurveillance of alglucerase enzyme therapy for Gaucher patients: Induction of humoral tolerance in seroconverted patients after repeat administration. *Blood*, v. 93 (6), pp. 2081-2088.
- Rudolph, N. S., 1999. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotechnology*, v. 17 (9), pp. 367-374.
- Sethuraman, N., Stadheim, T. A., 2006. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 17 (4), pp. 341-346.
- Schachter, H., 2000. The joys of HexNAc. The synthesis and function of *N*- and *O*-glycan branches. *Glycoconjugate Journal*, v. 17 (7-9), pp. 465-483.
- Schultz, W. B., 1995. Interim definition and elimination of lot-by-lot release for well-characterized therapeutic recombinant DNA-derived and monoclonal antibody biotechnology products, *US Federal Register*, v. 60 (236), pp. 63048-63049.
- Sidransky, E., 2004. Gaucher disease: Complexity in a "simple" disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 83 (1-2), pp. 6-15.

- Stanley, P., 1983. Selection of lectin-resistant mutants of animal cells. *Methods in Enzymology*, v. 96, pp. 157-184.
- Strober, W., 2001. Trypan blue exclusion teste of cell viability. *Current protocols in immunology*, v. 3, pp 3B.
- Tomiyal, N., Narang S., Lee, Y. C., Betenbaugh, M. J., 2004. Comparing *N*-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *Glycoconjugate Journal*, v. 21 (6), pp. 343–360.
- Van Patten, S. M., Hughes, H., Huff, M. R., Piepenhagen, A., Waire, J., Qiu, H., Ganesa, C., Reczek, D., Ward, P. V., Kutzko, J. P., Edmunds, T., 2007. Effect of mannose chain length on targeting of glucocerebrosidase for enzyme replacement therapy of Gaucher disease. *Glycobiology*, v. 17 (5), pp. 467-478.
- Walmsley, A. R., Hooper, N. M., 2003. Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons is independent of distance from the C-terminus in membrane dipeptidase. *Glycobiology*, v. 13 (9), pp. 641-646.
- Walsh, G., 2002. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: An issue of nomenclature. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 15 (2), pp. 135–138.
- Walsh, G., Jefferis, R., 2006. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature biotechnology*, v. 24 (10), pp. 1241-1252.
- Wang, M., Marín, A., 2006. Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene*, v. 366, pp. 219-227.
- Wenstrup, R. J., Bailey, L., Grabowski, G. A., Moskovitz, J., Oestreich, A. E., Wu, W., Sun, S., 2004. Gaucher disease: Alendronate disodium improves bone mineral density in adults receiving enzyme therapy. *Blood*, v. 104 (5), pp. 1253-1257.
- Wilmot, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind A. J., Campbell, K. H. S., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v. 385 (6619), pp. 810–813.

- Wirth, D., Gama-Norton, L., Riemer, P., Sandhu, U., Schucht, R., Hauser, H., 2007. Road to precision: recombinase-based targeting technologies for genome engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18 (5), pp. 411-419.
- Yasunaga, H., 2007. Risk of authoritarianism: fibrinogen-transmitted hepatitis C in Japan. *Lancet*, v. 370 (9604), pp 2063-2067.
- Yew, N. S., 2005. Controlling the kinetics of transgene expression by plasmid design. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57 (5), pp. 769-780.
- Yin, J., Li, G., Ren, X., Herrler, G., 2007. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, v. 127 (3), pp. 335-341.
- Xu, Y. H., Grabowski, G. A., 1998. Translation Inefficiency of acid β -glucosidase mRNA in transgenic mammalian cells. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 64 (2), pp. 87-98.
- Zhao, H, Grabowski, G. A., 2002. Gaucher disease: Perspectives on a prototype lysosomal disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 59 (4), pp. 694-707.

ANEXO I

ANEXO I.1: DETECÇÃO EM MEMBRANAS DA GBA

Ativação da membrana	Recobrir a membrana com metanol por 30 segundos e depois, reequilibrá-la em TBS por 1 minuto sob agitação;
Filtração	Montar o aparelho Bio-Dot®, colocando a membrana no seu interior, fechando-o corretamente. Aplicar, então, 200µL das amostras por poço e ligar o vácuo. Após a filtração ter terminado, desmontar o aparelho e retirar a membrana;
Bloqueio	Bloquear a membrana por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação em solução de TBS com 0,05% de Tween-20 (v/v) e 5% de leite (p/v);
Rinsagem	Rinsar a membrana 2 vezes com uma solução de TBS com 0,05% de Tween-20 (v/v);
Incubação com o anticorpo primário	Incubar a membrana por 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação em solução de TBS com 0,05% de Tween-20 (v/v) e 0,5% de leite (p/v), contendo o anticorpo anti-GBA produzido em coelho (Sigma, # G4046, lote 018K4770) na diluição de 1:1.000;
Rinsagem	Rinsar a membrana 2 vezes com uma solução de TBS com 0,05% de Tween-20 (v/v);
Lavagem	Lavar 3 vezes por 5 minutos com uma solução de TBS com 0,05% de Tween-20 (v/v);
Incubação com o anticorpo secundário	Incubar a membrana por 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação em solução de TBS com 0,05% de Tween-20 (v/v) e 0,5% de leite (p/v), contendo o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (Sigma, # A9919, lote 107K4803) na diluição de 1:10.000;
Lavagem	Lavar 3 vezes por 5 minutos com uma solução de TBS com 0,05% de Tween-20 (v/v) e 2 lavagens de 5 minutos com uma solução de TBS;
Revelação	Revelar com uma solução Tris 100mM, NaCl 100mM, MgCl ₂ 5mM e pH 9,5 contendo BCIP e NBT (Promega, #S3771), que são substratos cromogênicos para a enzima fosfatase alcalina;

ANEXO I.2: COLORAÇÃO DE PROTEÍNAS COM PRATA

Solução de fixação (30 a 60 minutos)	100mL de etanol, 25mL de ácido acético e 125mL de água destilada. Volume final de 250mL de solução;
Solução de incubação (30 minutos)	75mL de etanol, 17g de acetato de sódio tri-hidratado, 1,3mL de glutaraldeído, 7,84g de tiosulfato de sódio penta-hidratado e água destilada qsp 250mL;
Lavagem com água destilada 3 vezes de 5 minutos	
Solução de prata (40 minutos)	0,25g de nitrato de prata, 50 µL de formaldeído e água destilada qsp 250mL;
Solução de revelação (até obter a coloração desejada)	6,25g de carbonato de sódio, 25 µL de formaldeído e água destilada qsp 250mL;
Solução de parada (2 vezes de 5 minutos)	3,65g de EDTA e água destilada qsp 250mL;
Solução de preservação	25 mL de glicerina e água destilada qsp 250mL;

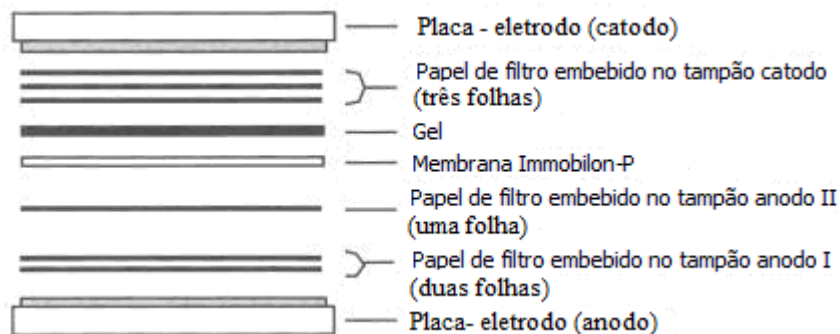
ANEXO I.3: TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS PARA UMA MEMBRANA

- Preparar as três soluções abaixo:

Tampão anodo I	0,3M de tris, 10% de metanol e pH 10,4;
Tampão anodo II	25mM de tris, 10% de metanol e pH10,4;
Tampão catodo	25mM de tris, 40mM de glicina, 10% de metanol e pH 9,4;

A membrana deve ser ativada em metanol por 30 segundos e, depois, estabilizada por 5 minutos no tampão anodo II antes da sua utilização.

Montar um “sanduíche” com folhas de papel de filtro embebidas nos tampões acima, o gel e a membrana na seguinte ordem:



A transferência foi realizada no aparelho *Trans-Blot* SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad), com amperagem constante de 200mA por 30 minutos.

Após a transferência a membrana sofreu as etapas de bloqueio, incubação com o anticorpo primário, lavagem, incubação com o anticorpo secundário, lavagem e revelação, realizadas da maneira descrita anteriormente no Anexo I.1.