

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ANA CAROLINA COELHO

Geração e caracterização funcional de nova molécula recombinante da  $\beta$ -glicosilceramidase humana portadora de mutações sinônimas

Ribeirão Preto

2018

ANA CAROLINA COELHO

Geração e caracterização funcional de nova molécula recombinante da  $\beta$ -glicosilceramidase humana portadora de mutações sinônimas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutora em Genética.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO, APÓS 24 MESES, A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Coelho, Ana Carolina

Geração e caracterização funcional de nova molécula recombinante da  $\beta$ -glicosilceramidase humana portadora de mutações sinônimas. Ribeirão Preto, 2018.

146 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientadora: Fontes, Aparecida Maria

1. Doença de Gaucher. 2.  $\beta$ -glicosilceramidase. 3. Enzima Recombinante. 4. Sistema Lentiviral.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: COELHO, AC

Título: Geração e caracterização funcional de nova molécula recombinante da  $\beta$ -glicosilceramidase humana portadora de mutações sinônimas.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Aprovado em: \_\_\_ / \_\_\_ /2018

### BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Aos meus amados pais, Silvana e Tadeu,  
dedico.*

*“I celebrate myself, and sing myself,  
And what I assume you shall assume,  
For every atom belonging to me as good belongs to you”. (...)*  
*(Song of Myself – 1892 version, Walt Whitman).*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora profa. Dra. Aparecida Maria Fontes pela oportunidade a mim concedida e pela contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Departamento de Genética e funcionários pela convivência e profissionalismo.

A todos do laboratório de Doenças Metabólicas Hereditárias e do Bloco B pelo suporte e amizade durante esses quatro anos.

As amigas Bete e Cláudia por todo o auxílio, companheirismo, conselhos, por estarem sempre de braços abertos para me ajudar. Muito obrigada pela amizade construída.

Aos amigos de Ribeirão Preto: Frederico, Jéssica, Gabriella, Natália, Ana Rabelo, Fábio, Carolina, Wilson, Aline, Karina, Isaque, Tati, Alexandra, Larissa e Sarah pela paciência, conselhos, amizade, companheirismo e pelo suporte emocional e profissional durante todo o curso.

Aos meus amigos da graduação turma de Ciências Biológicas – UEM (2006- 2010) e aos amigos do mestrado Genética, Conservação e Biologia Evolutiva – INPA (2011-2013) pela amizade e suporte emocional.

Às minhas amigas de longa data Natália Duarte Bento e Poliana Maria Sachertt pelos conselhos e pelo companheirismo sempre. Muito obrigada pela verdadeira amizade durante todos esses anos!

À toda minha família, em especial aos meus pais Tadeu e Silvana, meus irmãos Monalisa, Leonardo e Bruna, meus cunhados Marcos e Alisson, minha cunhada Criciely, meus sobrinhos Giovanni, Clara Iná e Bêjamin Gabriel e as minhas meninas Travessa, Shakira, Menina e Gina (*in memoriam*), por todo amor, confiança, amizade e respeito. Por me amarem como sou e por fazerem de mim uma pessoa melhor. Amo vocês!

Agradeço a colaboração dos docentes da FMRP, FFCLRP e FCFRP do *campus* da USP de Ribeirão Preto, que possibilitaram a realização de experimentos em seus respectivos laboratórios e também auxiliaram com as discussões científicas, a Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior, Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, Prof. Dr. Adriano Silva Sebollela, Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi, Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson, Prof. Dr. Roy Edward Larson, Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo, Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto, Prof. Dr. Kuruvilla Joseph Abraham, Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco e ao Dr. Fermino Sanches Lizarte Neto, e as funcionárias Silvia Regina Andrade Nascimento e Tânia Paula Aguino Defina, bem como, as funcionárias

Anemarie Ramos Dinarte, Renata Rosada De Biase, Sandra Navarro Bresciani e Dra. Maristela Delgado Orellana do Hemocentro de Ribeirão Preto.

Agradeço a colaboração da Profa. Dra. Vânia D'Almeida da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e as funcionárias Joyce Umbelino da Silva Yamamoto e Dra. Vanessa Gonçalves Pereira que auxiliaram nos ensaios de padronização da atividade biológica *in vitro* da enzima lisossomal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma tornaram possível à realização deste trabalho. Muito obrigada!

## RESUMO

COELHO Ana Carolina. **Geração e caracterização funcional de nova molécula recombinante da  $\beta$ -glicosilceramidase humana portadora de mutações sinônimas.** 2018. 146 f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A doença de Gaucher (DG), causada por mutações no gene *GBA1*, é a primeira doença de depósito lisossomal descrita e tornou-se o modelo para a descrição clínica e fenotípica para as doenças desse grupo. A terapia de reposição enzimática é o principal tratamento disponível para pacientes com DG, porém de alto custo. Assim, visando obter uma linhagem celular humana com expressão estável e elevados níveis da enzima lisossomal recombinante *GBA* humana, a hipótese desse estudo é que a agregação do uso de códons sinônimos, engenharia genética e sistema lentiviral permitirá a geração de uma nova molécula recombinante biologicamente ativa *in vitro*. Para alcançar esse objetivo, primeiramente foi realizada a transfecção transiente a fim de avaliar se os vetores lentivirais eram funcionais, o que foi demonstrado pelo aumento da atividade de *GBA* no sobrenadante das linhagens por meio do ensaio de atividade biológica da GCcase. A partir desses resultados foram produzidas partículas lentivirais referentes às sequências de cDNA da *GBA* com os códons originais e sinônimos, ambas construções sob o controle do promotor HeF1 $\alpha$ . Os títulos lentivirais foram cerca de  $5,24 \times 10^8$  e  $7,88 \times 10^8$  PV/mL, referente aos plasmídeos LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT e LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN, respectivamente. Foram realizados seis ciclos de transdução com MOI entre 30-60, e após as transduções, as linhagens foram tratadas com puromicina. Seguido de clonagem celular das populações mistas foram selecionados os clones com níveis mais elevados da enzima recombinante. As análises de atividade biológica no sobrenadante da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM foi de 2,72 U/mL, enquanto que para L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM foi de 104,8 U/mL. Com relação aos clones que apresentaram níveis mais elevados de atividade da *GBA* obtivemos o clone 4 (19,73 U/mL) e o clone 9 (17,08 U/mL) para a L18, e os clones 15 (585,46 U/mL) e 16 (683,95 U/mL) para a L17. As análises de atividade intracelular da *GBA* para ambas as linhagens e seus respectivos clones mostraram níveis enzimáticos da ordem de 108,4 U/mg para a população mista da L18, 146,5 U/mg para o clone 4 e 159,8 U/mg para o clone 9. A atividade intracelular para a população mista da L17 foi de 307,5 U/mg e para os clones 15 e 16 foram cerca de 586,3 e 752,3 U/mg. O ensaio de espectrometria de massa mostrou a quantificação da enzima lisossomal recombinante no sobrenadante e intracelular produzida pela linhagem celular L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM e os resultados mostraram níveis similares a *GBA* produzida pela linhagem celular virgem. Por outro lado, a linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM apresentou elevados níveis da enzima lisossomal recombinante *GBA* no sobrenadante da ordem de 38,39  $\mu$ g de *GBA* e os clones 15 e 16 cerca de 60,15 e 53,23  $\mu$ g de *GBA*, respectivamente. A quantificação da enzima *GBA* recombinante intracelular foi cerca de 14,08  $\mu$ g para a população mista e para os clones 15 e 16 foi de 6,17 e 5,34  $\mu$ g de *GBA*, respectivamente. Foi realizado também o escalonamento da população mista L17 e os resultados mostraram ser possível a expansão da produção da *GBA* em larga escala. Desta forma, concluímos que o sistema lentiviral foi efetivo e esse conjunto de informações levam a interpretação de que o uso de códons sinônimos pode consistir em uma estratégia promissora para obtenção de uma linhagem celular humana com elevados níveis da enzima lisossomal recombinante.

Palavras-chave: Doença de Gaucher.  $\beta$ -glicosilceramidase. Enzima Recombinante. Sistema Lentiviral.

## ABSTRACT

COELHO Ana Carolina. **Generation and functional characterization of a new recombinant molecule of human  $\beta$ -glucosylceramidase carrying synonymous mutations.** 2018. 146 f. Thesis (PhD in Genetics) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Gaucher disease (DG), caused by mutations in the GBA1 gene, is the first lysosomal storage disease described and has become the model for the clinical and phenotypic description of the diseases in that group. Enzyme replacement therapy is the main treatment available for patients with DG, but high cost. Thus, in order to obtain a human cell line with stable expression and high levels of recombinant human GBA lysosomal enzyme, the hypothesis of this study is that the aggregation of the use of synonymous codons, genetic engineering and lentiviral system will allow the generation of a new biologically active recombinant molecule in vitro. To achieve this goal, transient transfection was first performed to assess whether the lentiviral vectors were functional, which was demonstrated by the increase of GBA activity in the supernatant of the lineages by the biological activity assay of GCCase. From these results lentiviral particles were produced relative to the GBA cDNA sequences with the original and synonymous codons, both constructs under the control of the HeF1 $\alpha$  promoter. The lentiviral titers were about  $5.24 \times 10^8$  and  $7.88 \times 10^8$  PV / mL, referring to plasmids LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT and LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN, respectively. Six cycles of MOI transduction were performed between 30-60, and after transduction, the lines were treated with puromycin. Following cloning of the mixed populations, clones with higher levels of the recombinant enzyme were selected. Analyzes of biological activity in the supernatant of the L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM line was 2.72 U / ml, whereas for L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM it was 104.8 U / ml. In relation to the clones that presented higher levels of GBA activity, we obtained clone 4 (19.73 U / mL) and clone 9 (17.08 U / mL) for L18, and clones 15 (585.46 U / mL) and 16 (683.95 U / mL) for L17. Intracellular activity analyzes of GBA for both strains and their respective clones showed enzyme levels in the order of 108.4 U / mg for the mixed population of L18, 146.5 U / mg for clone 4 and 159.8 U / mg for clone 9. Intracellular activity for the mixed population of L17 was 307.5 U / mg and for clones 15 and 16 were about 586.3 and 752.3 U / mg. The mass spectrometry assay showed quantification of the recombinant lysosomal enzyme in the supernatant and intracellular produced by the cell line L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM and the results showed levels similar to GBA produced by the virgin cell line. On the other hand, the lineage L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM showed high levels of GBA recombinant lysosomal enzyme in the supernatant on the order of 38.39  $\mu$ g GBA and clones 15 and 16 about 60.15 and 53.23  $\mu$ g GBA, respectively. The quantification of recombinant intracellular GBA enzyme was about 14.08  $\mu$ g for the mixed population and for clones 15 and 16, it was 6.17 and 5.34  $\mu$ g GBA, respectively. It was also carried out the scheduling of the mixed population L17 and the results showed that it is possible to expand the production of GBA on a large scale. In this way, we conclude that the lentiviral system was effective and this set of information leads to the interpretation that the use of synonymous codons may consist of a promising strategy to obtain a human cell line with high levels of the recombinant lysosomal enzyme.

Keywords: Gaucher Disease. Glucosylceramide beta. Recombinant Enzyme. Lentiviral System.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reação catalisada pela *GBA* na presença do cofator Saposina C. O substrato glicosilceramida é hidrolisado em glicose e ceramida pelo complexo GlcCer + Saposina C. Modificado de Dvir et al., 2003.....25
- Figura 2.** Localização cromossômica do gene *GBA* (1q22). **Fonte:** *Genome Decoration Page/NCBI*.....28
- Figura 3.** Estrutura de raios-X da  $\beta$ -glucosilceramidase. O domínio I é mostrado em roxo e contém as duas pontes de dissulfeto, cujos átomos de enxofre são mostrados como círculos verdes, o domínio II é mostrado em verde. O domínio catalítico (domínio III) é mostrado em azul, bem como os resíduos do sítio ativo E235 e E340 também são evidenciados. As seis mutações mais comuns da  $\beta$ -glucosilceramidase (*GlcCer*ase) são mostradas como círculos, com aquelas que causam predisposição para doença grave (tipos 2 e 3) em vermelho e leve (tipo 1) em amarelo. **Fonte:** Dvir et al., 2003.....29
- Figura 4.** Fluxograma resumido das etapas desenvolvidas nesse trabalho.....45
- Figura 5.** Desenho esquemático dos vetores plasmidiais desenvolvidos para a geração das linhagens com produção permanente da GCase. (A) Plasmídeo portador da sequência de cDNA referente a *GBA* com códons originais; (B) Plasmídeo portador da sequência de cDNA da *GBA* com códons sinônimos.....46
- Figura 6.** Curva Padrão de BSA para quantificação de proteína total presente no lisado celular pelo método de Lowry. A equação da reta permite fazer a correlação entre os valores obtidos de absorbância e a quantidade conhecida de BSA em mg/mL.....58
- Figura 7.** Curva Padrão com 4MU para análise de atividade biológica. (A) Curva padrão para análise de amostras de sobrenadante; (B) Curva padrão para análise de amostras de intracelular. URF: Unidades Relativas de Fluorescência.....59
- Figura 8.** Curva padrão de BSA para quantificação de proteína total das linhagens geradas com produção permanente da *GBA*, pelo método de Bradford. A equação da reta permite fazer a correlação entre os valores obtidos de absorbância pela quantidade conhecida de BSA. (A) Curva referente à quantificação de proteína total presente no sobrenadante; (B) Curva referente à quantificação de proteína total presente no lisado celular.....61
- Figura 9.** Curva padrão de r*GBA* (Imiglucerase) para quantificação da *GBA* presente no sobrenadante das linhagens com produção transiente de GCase.....62
- Figura 10.** Curva padrão de r*GBA* (Imiglucerase) para quantificação da *GBA* presente no sobrenadante e no lisado celular das linhagens com produção permanente de GCase. (A) Curva

referente ao peptídeo SYFSEEGIGYNIIR; (B) Curva referente ao peptídeo VVLTDPEAAK.....62

**Figura 11.** Curva padrão realizada com o DNA padrão do kit *QuantiFluor<sup>®</sup>dsDNA System*, para quantificação por fluorescência das amostras para cálculo do número de cópias.....64

**Figura 12.** Atividade biológica transiente da GCCase no sobrenadante celular. (A) A linhagem 293FT/CMV\_GBA\_WT apresentou atividade enzimática da GCCase 1,4 e 2,4 vezes maior em relação a MOCK e 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT, respectivamente; (B) A linhagem 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN apresentou atividade da GCCase 28,4 vezes maior em relação a MOCK e 5,2 vezes maior em relação a 293FT/CMV\_GBA\_SYN; (C) Entre as linhagens sob o controle do promotor CMV, a linhagem 293FT/CMV\_GBA\_SYN apresentou níveis de atividade 3,87 vezes mais elevado em relação a 293FT/CMV\_GBA\_WT; (D) A linhagem 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN apresentou atividade 48 vezes mais elevada em relação a 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT.....68

**Figura 13.** Comparação entre os níveis de atividade biológica transiente da GCCase no sobrenadante celular das linhagens pelo teste de ANOVA e pós teste de Tukey (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).....69

**Figura 14.** Concentração em  $\mu\text{g}$  de GBA a partir de 100 $\mu\text{g}$  de proteína total, presente em 4mL de sobrenadante da linhagem 293FT transfectada com os vetores plasmidiais MOCK, LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_P<sup>+</sup> e LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup>.....71

**Figura 15.** DNA genômico isolado das linhagens 293FT/Virgem e 293FT transduzida com 2, 5 e 10 $\mu\text{L}$  do concentrado viral. (A) M - Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III; (V1 e V2) DNAg da linhagem 293FT/Virgem; DNAg das linhagens transduzidas com as diferentes quantidades do concentrado lentiviral referente ao plasmídeo LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_P<sup>+</sup>; (B) M - Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III; (V1 e V2) DNAg da linhagem 293FT/Virgem; DNAg das linhagens transduzidas com as diferentes quantidades do concentrado lentiviral referente ao plasmídeo LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup>.....73

**Figura 16.** Atividade biológica da GCCase. Níveis de atividade biológica da GCCase no sobrenadante da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM em comparação com a 293FT/Virgem cultivadas em meio reduzido de soro. (A) A linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM obteve uma produção em nmol/ml/h 107 vezes mais elevada em relação a virgem; (B) O valor de atividade de GCCase quando corrigido por milhão de células foi 121 vezes mais elevado na L17 em relação a virgem.....74

<b>Figura 17.</b> Atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular da linhagem L17_293FT_GBA_SYN_PM. Níveis de atividade da GCCase em meio DMEM suplementado com 10% SBF. A população mista da linhagem L17 tratada com 5µg/mL de puromicina produziu 1,3 vezes mais enzima em relação a mesma linhagem tratada com 1µg/mL de puromicina e 62,4 vezes mais que a linhagem virgem. Em relação à virgem, a L17 tratada com 1µg/mL de antibiótico apresentou níveis de atividade da GCCase 46,8 vezes mais elevado.....	78
<b>Figura 18.</b> Atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular da linhagem L17_293FT_GBA_SYN_PM no meio extracelular corrigido por milhão de células após o tratamento com 1 e 5 µg/mL do antibiótico puromicina.....	79
<b>Figura 19.</b> Atividade biológica da GCCase. Níveis de atividade biológica da GCCase no sobrenadante da linhagem L17_293FT_GBA_SYN_PM em meio DMEM com 10% SBF e em meio Opti-MEM.....	80
<b>Figura 20.</b> Atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular da linhagem L18_293FT_GBA_WT_PM na presença de SBF. (A) A população mista da linhagem L18 apresentou níveis de atividade 3 vezes mais elevado em relação a virgem; (B) Os níveis de atividade de GCCase por milhão de células da população mista da linhagem L18 foi 5,3 vezes mais elevado em comparação com a linhagem virgem.....	82
<b>Figura 21.</b> Atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular da linhagem L18_293FT_GBA_WT_PM em comparação com a atividade da GCCase no sobrenadante da linhagem 293FT virgem. A população mista da linhagem L18 apresentou níveis de atividade 1,4 vezes inferior em relação a célula virgem.....	83
<b>Figura 22.</b> Atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular. Atividade biológica da GBA em meio de cultivo DMEM sem SBF da população mista L17_293FT_GBA_SYN_PM em sistemas de pequena (2mL) e larga escala (500mL).....	84
<b>Figura 23.</b> Atividade biológica da GCCase. Níveis de atividade biológica da GCCase no meio extracelular dos 13 clones da linhagem L18_293FT_GBA_WT.....	87
<b>Figura 24.</b> Atividade biológica da GCCase. Níveis de atividade biológica da GCCase no meio extracelular dos 13 clones da linhagem L18_293FT_GBA_WT corrigido por milhão de células.....	87
<b>Figura 25.</b> Atividade biológica da GCCase. Níveis de atividade biológica da GCCase no meio extracelular dos 11 clones da linhagem L17_293FT_GBA_SYN.....	88

<b>Figura 26.</b> Atividade biológica da GCase. Níveis de atividade biológica da GCase no meio extracelular dos 11 clones da linhagem L17_293FT_GBA_SYN corrigido por milhão de células.....	89
<b>Figura 27.</b> Atividade específica da enzima recombinante GCase produzida pelas linhagens L18 e L17. A população mista da L18 apresentou atividade da GCase cerca de 1,13 vezes mais elevada em comparação com a linhagem virgem e a L17 obteve uma produtividade de 3,2 vezes mais que a virgem. Entre a população mista de L17 e L18 a diferença foi de 2,84 vezes mais na linhagem L17 em relação a L18.....	91
<b>Figura 28.</b> A atividade intracelular da GCase para o clone 4 da L18 foi cerca de 1,35 vezes maior em relação à produção da população mista da mesma linhagem L18. Comparando o clone 9 com o clone 4, a diferença não foi estatisticamente significativa, mas em comparação com a população mista, o clone 9 apresentou atividade intracelular da GCase 1,5 vezes mais elevada.....	92
<b>Figura 29.</b> A atividade intracelular da GCase para o clone 16 da L17 foi 2,45 vezes mais elevada em comparação com a produção da população mista ( $p = 0,0064$ ) e 1,28 vezes maior em comparação com o produzido pelo clone 15. Quando o clone 15 foi comparado com a população mista, este produziu 1,9 vezes mais atividade intracelular da GCase ( $p = 0,23$ ).....	93
<b>Figura 30.</b> Produtividade da linhagem celular L17_293FT/GBA_SYN_PM, os clones 15 e 16 derivados da mesma e da linhagem celular controle (293FT virgem). O número de unidades de GBA biologicamente ativa foram determinadas pelo ensaio fluorimétrico. A produtividade dos clones 15 e 16 são cerca de 1,96 vezes e 1,84 vezes, respectivamente maior comparada a população mista.....	94
<b>Figura 31.</b> Concentração em micrograma ( $\mu\text{g}$ ) de GCase a partir de 100 $\mu\text{g}$ de proteína total presente no sobrenadante da linhagem 293FT/Virgem e das populações mistas L18 e L17. A linhagem 17 produziu 43,9 vezes mais que a virgem e 23,7 vezes mais de GBA que a L18. A L18 em comparação com a virgem produziu 1,8 vezes mais de GBA no sobrenadante celular.....	96
<b>Figura 32.</b> Concentração de GCase a partir de 100 $\mu\text{g}$ de proteína total presente no sobrenadante da população mista linhagem 18 e dos clones 4 e 9. A linhagem 18 produziu 2,6 vezes mais que o clone 4 e 1,04 vezes mais que o clone 9. O clone 9 obteve 2,4 vezes mais GCase no sobrenadante em comparação com o obtido pelo clone 4.....	97
<b>Figura 33.</b> Número de células por cultura celular. O crescimento da população mista foi cerca de 1,8 vezes maior comparado com o clone 4 ( $p = 0,03$ ). Em relação ao clone 9, o mesmo	

mostrou um crescimento celular cerca de 1,6 vezes maior comparado ao clone 4 ( $p = 0,04$ ).....98

**Figura 34.** Concentração de GCCase a partir de 100 $\mu$ g de proteína total presente no sobrenadante da população mista da linhagem 17 e dos clones 15 e 16. O clone 15 produziu 1,6 vezes mais que a população mista e 1,13 vezes mais que o clone 16. O clone 16 obteve 1,4 vezes mais GCCase no sobrenadante em comparação com o obtido pela população mista.....99

**Figura 35.** Concentração de GCCase presente no lisado celular da linhagem 293FT/Virgem e das populações mistas L18 e L17 a partir de 100 $\mu$ g de proteína total. A linhagem 17 produziu 5,2 vezes mais que a virgem e 4,7 vezes mais GCCase que a L18. A L18 em comparação com a virgem produziu 1,12 vezes mais GCCase no lisado celular.....100

**Figura 36.** Concentração de GCCase presente no lisado celular da linhagem 293FT/Virgem, da população mista L18 e seus respectivos clones a partir de 100 $\mu$ g de proteína total. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a produção de GCCase intracelular.....101

**Figura 37.** Concentração de GCCase presente no lisado celular da linhagem 293FT/Virgem, da população mista L17 e seus respectivos clones, a partir de 100 $\mu$ g de proteína total. Houve diferença estatisticamente significativa entre a produção de GCCase intracelular da população mista em comparação com os clones, tendo sido 2,3 e 2 vezes mais produtivos os clones 15 e 16, respectivamente.....102

**Figura 38.** DNA para cálculo do número de cópias. (A) (M) Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III; (1) DNA plasmidial LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_P<sup>+</sup>; (2) DNA plasmidial LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_P<sup>+</sup> digerido e purificado; (3) DNAg da linhagem 293FT/Virgem; (4) DNAg da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM; (5) DNAg da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_CL.4; (6) DNAg da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_CL.9; (B) (M) Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III; (1) DNA plasmidial LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup>; (2) DNA plasmidial LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup> digerido e purificado; (3) DNAg da linhagem 293FT/Virgem; (4) DNAg da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM; (5) DNAg da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_CL.15; (6) DNAg da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_CL.16.....103

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sonda inventoriada para a $\beta$ -actina. Par de <i>primers</i> e sonda para o gene LTR, utilizados para cálculo do título viral.....	51
<b>Tabela 2.</b> Eficiência dos <i>primers</i> utilizados na <i>qPCR</i> do cálculo do título viral referente às sequências de cDNA da <i>GBA</i> selvagem e otimizada.....	51
<b>Tabela 3.</b> Diluição seriada (1:10) do DNAg isolado da linhagem celular 293FT/Virgem a partir de $3 \times 10^5$ cópias do gene da $\beta$ -actina e do DNA plasmidial digerido e purificado (pLV_B4B2_Hef1 $\alpha$ _GBA_WT_UbC_Puro e pLV_B4B2_Hef1 $\alpha$ _GBA_Mut_UbC_Puro) a partir de $3 \times 10^5$ cópias do gene LTR.....	54
<b>Tabela 4.</b> Par de <i>primers</i> para o gene da Albumina e do WPRE, utilizados para cálculo do número de cópias integradas do gene da <i>GBA</i> .....	63
<b>Tabela 5.</b> Eficiência dos <i>primers</i> utilizados na <i>qPCR</i> do cálculo do número de cópias referente às sequências de cDNA da <i>GBA</i> selvagem e otimizada.....	64
<b>Tabela 6.</b> Quantificação das amostras por fluorescência, para cálculo do número de cópias.....	65
<b>Tabela 7.</b> Dados de atividade biológica da GCCase no sobrenadante das linhagens com produção transiente.....	67
<b>Tabela 8.</b> Valores médios obtidos de área e seu valor correspondente em $\mu$ g de proteína para cada peptídeo analisado (cinco no total), o que na média resulta na quantidade de <i>GBA</i> em $\mu$ g presente no sobrenadante da cultura celular.....	70
<b>Tabela 9.</b> Imunoensaio enzimático - Confirmação da presença do lentivírus no sobrenadante celular por ELISA, pela detecção da presença do antígeno da cápsula viral P24.....	72
<b>Tabela 10.</b> Dados de atividade biológica da GCCase no sobrenadante da linhagem L17_293FT_GBA_SYN_PM após 48h de cultivo em meio reduzido de soro, e a atividade da mesma por milhão de células.....	73
<b>Tabela 11.</b> Dados de atividade biológica da GCCase no sobrenadante da linhagem L17_293FT_GBA_SYN_PM tratada com baixa e alta estringência do antibiótico puromicina (1 e $5 \mu$ g/mL), após 48h de cultivo em DMEM suplementado com 10% SBF e na ausência de SBF.....	76
<b>Tabela 12.</b> Dados de atividade biológica da GCCase no sobrenadante da linhagem L18_293FT_GBA_WT_PM após 48h de cultivo em meio DMEM na presença de SBF, e a produtividade da mesma por milhão de células.....	81

<b>Tabela 13.</b> Dados de atividade biológica da GCase no sobrenadante celular dos clones da linhagem L18_293FT_GBA_WT após 48h de cultivo em meio DMEM (10% SBF), e a atividade dos mesmos por milhão de células.....	85
<b>Tabela 14.</b> Dados de atividade biológica da GCase no sobrenadante celular dos clones da linhagem L17_293FT_GBA_SYN após 48h de cultivo em meio DMEM (10% SBF), e a atividade dos mesmos por milhão de células.....	86
<b>Tabela 15.</b> Atividade biológica intracelular da GCase nas linhagens 293FT/Virgem, L18_293FT_GBA_WT_PM e L17_293FT_GBA_SYN_PM e dos dois clones mais produtivos de cada uma das linhagens, após 48h de cultivo em DMEM (10% SBF), corrigida pela proteína total, ou seja, atividade específica.....	90
<b>Tabela 16.</b> Número de células e valores médios obtidos em µg de GCase pela análise de espectrometria de massa presente no sobrenadante e no lisado celular.....	95
<b>Tabela 17.</b> Cálculo do número de cópias integradas do gene da <i>GBA</i> com base nas curvas referência para o gene endógeno albumina e para a sequência de cópia única WPRE presente nas construções lentivirais.....	104
<b>Tabela 18.</b> Cálculo do número de cópias integradas do gene da <i>GBA</i> com base nas curvas referência para o gene endógeno albumina e para a sequência de cópia única WPRE presente nas construções lentivirais.....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
BSA	Albumina de soro bovino
CAI	<i>Codon Adaptation Index</i>
cDNA	DNA complementar
CHO	Célula de ovário de <i>hamster</i> chinês
CL.	Clone
CMV	<i>Human cytomegalovirus immediated-early enhancer and promoter</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CV%	Coefficiente de variação
DG	Doença de Gaucher
DH5 $\alpha$	Bactéria <i>E. coli</i> competente
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA <sub>g</sub>	DNA genômico
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
<i>GBA/GBA1</i>	$\beta$ -Glicosilceramidase/GBA lisossomal
<i>GBAP</i>	Pseudogene da GBA
GCase	$\beta$ -Glicosilceramidase
GlcCer	Glicosilceramida
GlcCerase	Glicosilceramidase
GWASs	<i>Genome-wide association studies</i>
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	<i>Hydroxyethyl-piperazineethane-sulfonic acid buffer</i>
HeF1 $\alpha$	<i>Human elongation factor-1</i>
KCl	Cloreto de potássio

KOH	Hidróxido de potássio
LB	Luria Bertani
LIMP-2	Proteína lisossomal integral de membrana
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
LV	<i>Lentiviral vector</i>
L17	Linhagem 17
L18	Linhagem 18
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
MLV	<i>Murine leukemia virus</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Ortovanato de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Opti-MEM	<i>Reduced Serum Media</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PM	População mista
PSAP	<i>Prosaposin</i>
PV	Partículas Virais
PVDF	Fluoreto de polivinilideno hidrofílico
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
rGBA	GBA recombinante, do inglês <i>recombinant GBA</i>
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RNA <sub>t</sub>	RNA transportador
SBF	Soro bovino fetal
SCARB2	<i>Scavenger receptor class B member 2</i>
SNPs	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SYN	<i>Synonymous</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TDC	<i>Sodium taurodeoxycholate hydrate</i>
TRE	Terapia de Reposição Enzimática
TRS	Terapia de Redução de Substrato

UbC	Ubiquitina
URF	Unidades Relativas de Fluorescência
UTR	<i>Untranslated region</i>
VPRIV	Alfa-velaglucerase
VSV-G	<i>Vesicular stomatitis virus G glycoprotein</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome</i>
WPRE	<i>Posttranscriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus</i>
WT	<i>Wild Type</i>
4MU	4-metilumbiliferona
4MUG	4-metilumbiliferona- $\beta$ -D-glicopiranosídeo

## **NOTA DE ESCLARECIMENTO**

Espera-se que o produto desse projeto de pesquisa gere uma patente. Para evitar a quebra de novidade, atividade inventiva e suficiência descritiva, requisitos mínimos de patenteabilidade, os resultados foram apresentados sem mencionar as mutações geradas (mutações não caracterizadas).

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.1	DOENÇA DE GAUCHER.....	25
1.2	$\beta$ -GLICOSILCERAMIDASE.....	27
1.3	TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA.....	30
1.4	SISTEMA LENTIVIRAL.....	33
1.5	CÓDONS SINÔNIMOS.....	36
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
5.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	44
5.2	LINHAGEM CELULAR HUMANA 293FT.....	45
5.3	VETORES PLASMIDIAIS.....	46
5.3.1	Obtenção dos Vetores Plasmidiais.....	46
5.3.1.1	Transformação Bacteriana.....	46
5.3.1.2	Midi-preparação de DNA plasmidial.....	47
5.4	CULTIVO E EXPANSÃO DA LINHAGEM CELULAR HUMANA 293FT.....	47
5.5	GERAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES HUMANAS COM PRODUÇÃO TRANSIENTE DA GCase.....	48
5.6	GERAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES HUMANAS COM PRODUÇÃO ESTÁVEL DA GCase.....	49
5.6.1	Produção Lentiviral por meio de Transfecção.....	49
5.6.2	Ensaio Imunoenzimático – ELISA.....	49
5.6.3	Concentração do Sobrenadante Lentiviral.....	50
5.6.4	Cálculo do Título Viral.....	50
5.6.4.1	Padronização dos <i>Primers</i> .....	51
5.6.4.2	Linearização e Purificação dos Vetores Plasmidiais.....	52
5.6.4.3	PCR quantitativo em Tempo Real.....	52
5.6.4.4	Cálculo do título viral por PCR quantitativo em Tempo Real.....	53
5.7	TRANSDUÇÃO LENTIVIRAL.....	54
5.8	PRODUÇÃO DA GCase PELAS LINHAGENS L17_293FT_GBA_SYN E L18_293FT_GBA_WT.....	55
5.8.1	Tratamento das populações mistas com o antibiótico puromicina.....	55

5.8.2	Produção da GCase pela população mista da linhagem L17_293FT_GBA_SYN_PM em meio reduzido de soro – Opti-MEM da Gibco® .....	55
5.8.3	Produção da GCase pela população mista da linhagem L17_293FT_GBA_SYN_PM tratada com o antibiótico puromicina nas concentrações de 1µg/mL e 5µg/mL.....	55
5.8.4	Produção da GCase pela população mista da linhagem L18_293FT_GBA_WT_PM tratada com o antibiótico puromicina na concentração de 2µg/mL.....	56
5.8.5	Escalonamento da produção de GCase no sobrenadante das linhagens L17_293FT_GBA_SYN_PM e L18_293FT_GBA_WT_PM .....	56
5.8.6	Produção de Clones.....	56
5.8.6.1	Seleção dos Clones.....	57
5.8.7	Produção da GCase intracelular pela população mista e clones selecionados das linhagens L17_293FT_GBA_SYN e L18_293FT_GBA_WT.....	57
5.9	ATIVIDADE BIOLÓGICA POR ENSAIO FLUORIMÉTRICO.....	57
5.10	ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	60
5.11	NÚMERO DE CÓPIAS INTEGRADAS DA SEQUÊNCIA DO cDNA DA GBA SELVAGEM E OTIMIZADA PELA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	63
5.11.1	Cálculo do Número de Cópias Integradas.....	63
5.11.2	Padronização dos <i>Primers</i> .....	63
5.11.3	PCR quantitativo em Tempo Real.....	64
5.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
6	RESULTADOS.....	66
6.1	PRODUÇÃO TRANSIENTE DA GCase RECOMBINANTE HUMANA .....	66
6.1.1	Atividade da GCase no sobrenadante celular das populações transientes.....	66
6.1.2	Quantificação da GCase por espectrometria de massa produzida pelas populações transientes.....	69
6.2	PRODUÇÃO DAS LINHAGENS PERMANENTES TRANSDUZIDAS COM AS PARTÍCULAS LENTIVIRAIS.....	71
6.2.1	Identificação da formação de partículas lentivirais por teste imunoenzimático.....	71
6.2.2	Cálculo do título viral dos vetores LV_HeF1α_GBA_WT_P <sup>+</sup> e LV_HeF1α_GBA_SYN_P <sup>+</sup> .....	72
6.3	PRODUÇÃO DA GCase PELAS LINHAGENS PERMANENTES L17_293FT_GBA_SYN E L18_293FT_GBA_WT.....	73
6.3.1	Produção da GCase pela população mista da linhagem L17_293FT_GBA_SYN_PM em meio reduzido de soro – Opti-MEM da Gibco® .....	73

6.3.2	Produção da GCCase pela população mista da linhagem L17_293FT_GBA_SYN_PM tratada com diferentes concentrações do antibiótico puromicina.....	74
6.3.3	Produção da GCCase pela população mista da linhagem L18_293FT_GBA_WT_PM tratada com o antibiótico puromicina.....	80
6.3.4	Escalonamento da produção da GCCase no sobrenadante da linhagem L17_293FT_GBA_SYN_PM.....	83
6.4	GERAÇÃO DE CLONES CELULARES DAS LINHAGENS L17_293FT_GBA_SYN_PM E L18_293FT_GBA_WT_PM.....	84
6.4.1	Análise e Seleção dos Clones celulares pela atividade biológica da GCCase no sobrenadante das linhagens L17_293FT_GBA_SYN_PM e L18_293FT_GBA_WT_PM.....	84
6.4.2	Produção da GCCase intracelular pela população mista e por clones selecionados das linhagens L17_293FT_GBA_SYN e L18_293FT_GBA_WT.....	89
6.4.3	Quantificação da GCCase por espectrometria de massa no sobrenadante e no lisado celular das linhagens com produção permanente.....	94
6.5	QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS INTEGRADAS DA SEQUÊNCIA DO cDNA DA GBA SELVAGEM E OTIMIZADA PELA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	102
7	<b>DISCUSSÃO.....</b>	106
8	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	116
9	<b>CONCLUSÕES.....</b>	118
10	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	119
11	<b>ANEXO: DISPENSA DO TCLE.....</b>	129
12	<b>APÊNDICE: MANUSCRITO.....</b>	130

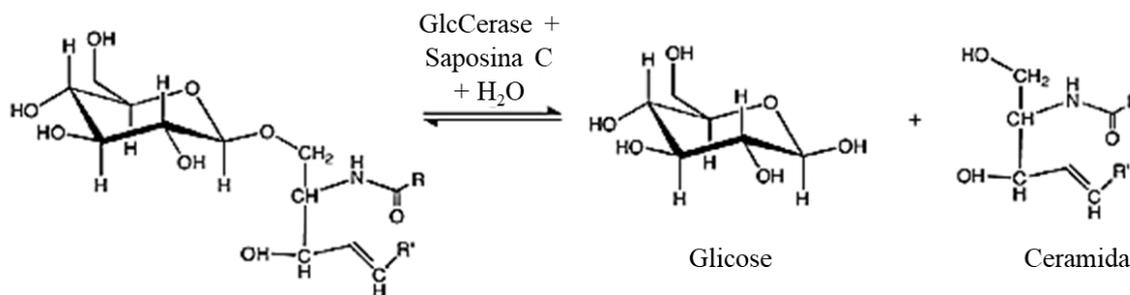
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇA DE GAUCHER

As doenças de depósito lisossomal são um grupo heterogêneo de doenças raras, resultantes do acúmulo de macromoléculas não digeridas ou parcialmente digeridas no lisossomo (ou na célula), devido à deficiência de hidrolases lisossomais (Dandana et al., 2016). A doença de Gaucher (DG) é considerada o modelo para a descrição clínica e fenotípica para as doenças desse grupo. É causada pela deficiência hereditária da enzima  $\beta$ -glicosilceramidase, responsável pela hidrólise da ligação  $\beta$ -glicosídica do substrato glicosilceramida (GlcCer), um esfingolípido de membrana (Beutler e Grabowski, 2001; Jmoudiak e Futerman, 2005; Aflaki et al., 2014; Baris, Cohen e Mistry, 2014) (Figura 1).

A deficiência de GCCase se deve a mutações bialélicas no gene *GBA1*, o que leva ao acúmulo do GlcCer nos lisossomos, e resulta em manifestações clínicas, principalmente nos órgãos envolvidos no sistema reticuloendotelial (Baris, Cohen e Mistry, 2014; Zimran e Elstein, 2016; Zimran et al., 2017). Esses macrófagos contendo altas concentrações de GlcCer são denominados de “células de Gaucher”, e esse acúmulo leva a quadros patológicos da doença, uma vez que o GlcCer é um constituinte das membranas biológicas e intermediário nas vias de síntese e degradação do complexo esfingolípido (Jmoudiak e Futerman, 2005).

O *turnover* de GlcCer é baixo nos neurônios e seu acúmulo é significativo quando há uma diminuição drástica na atividade residual de GCCase (Orvisky et al., 2002), o que pode ser observado associado a mutações que levam a quadros clínicos mais graves da doença, como nos subtipos 2 e 3. Em *Drosophila* modelo para DG neuropática, foi observada autofagia comprometida nos seus cérebros, que apresentavam deficiência de GCCase (Kinghorn et al., 2016).



Glucosilceramida - GlcCer

**Figura 1.** Reação catalisada pela *GBA* na presença do cofator Saposina C. O substrato glicosilceramida é hidrolisado em glicose e ceramida pelo complexo GlcCer + Saposina C. Modificado de Dvir et al., 2003.

Fenotipicamente a DG caracteriza-se, pela esplenomegalia e hepatomegalia, sendo que há infiltração das células de Gaucher principalmente no baço, fígado e medula óssea, mas outros órgãos também são afetados. O acúmulo do substrato GlcCer nas células de Gaucher é considerado o acontecimento inicial para o desenvolvimento de complicações ósseas e até mesmo necrose, devido à compressão vascular (Mikosch e Hughes, 2010). Os sintomas da DG podem variar de indivíduos assintomáticos a até graves quadros clínicos levando a morte nos primeiros anos de vida (Mistry, 2015). Clinicamente os pacientes são classificados por três diferentes subtipos da doença, no qual o subtipo 1 (OMIM#230800) é o mais comum e normalmente não causa dano neurológico, enquanto os subtipos 2 (OMIM#230900) e 3 (OMIM#231000) caracterizam-se por comprometimento neurológico (Sidransky, 2012). No entanto, essa classificação é simplista, uma vez que a DG neuropática representa um *continuum* fenotípico (Sidransky, 2012).

A DG tipo 1 é a forma mais frequente da doença e representa 95% dos casos descritos (Martins et al., 2009), com heterogeneidade clínica variando de pacientes assintomáticos a quadros graves de comprometimento ósseo e órgãos gravemente aumentados (Sidransky, 2012). Os órgãos geralmente afetados são o baço, fígado e medula óssea como já citado anteriormente, porém, em quadros clínicos graves há também o comprometimento dos pulmões e dos rins. Quadros de hepatoesplenomegalia, anemia e trombocitopenia com sangramento, são comuns em pacientes tipo 1 não tratados (Germain, 2004; Mehta, 2006). Os pacientes com DG tipo 1 são tratados principalmente por terapia de reposição enzimática, que assim como a terapia de redução de substrato, têm apresentado efeitos significativos sobre a dor óssea, anemia e redução do tamanho do fígado e baço, o que conferiu melhora também na expectativa e qualidade de vida desses pacientes (Maas, Poll e Terk, 2002; Dandana et al., 2016).

A DG tipo 2 é denominada de neuropática aguda, uma vez que se manifesta logo na primeira infância e a deterioração neurológica progride rapidamente, acarretando a morte antes dos dois anos de idade (Pastores, 2010). Para os pacientes com DG tipo 2 ainda não há tratamento eficiente, uma vez que a enzima não tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, resumindo à cuidados paliativos. Esses sintomas de caráter neurológico incluem hipotonia, cognição progressivamente prejudicada, deficiência auditiva, envolvimento ocular incluindo visão prejudicada, apraxia ocular, estrabismo e oftalmoparesia (Baris, Cohen e Mistry, 2014).

A DG tipo 3 é conhecida como a forma neuropática crônica ou subaguda da doença e apresenta envolvimento neurológico variável, manifestando-se geralmente na adolescência, e a expectativa de vida pode chegar até 60 anos (Tylki-Szymańska, Keddache e Grabowski, 2006;

Pastores, 2010). Os sintomas neurológicos na DG 3 incluem apraxia oculomotora, convulsões, epilepsia mioclônica progressiva e, posteriormente, demência e ataxia (Tylki-Szymańska, Keddache e Grabowski, 2006) e, neste caso, os pacientes podem se beneficiar do tratamento com reposição enzimática ainda que os sintomas neurológicos não regredam (Vellodi et al., 2009).

DG é a doença de depósito lisossômico mais frequente no mundo afetando 1 a cada 40.000 indivíduos na população em geral, e 1 a cada 850 indivíduos da etnia judaica Ashkenazi (Zimran e Elstein, 2016). Foram descritas 420 mutações para o gene *GBA*, de acordo com o *The Human Gene Mutation Database - HGMD*<sup>®</sup>, e no mundo as mutações mais comuns são N370S/N370S, já no Brasil o genótipo mais comum identificado foi o N370S/L444P, de acordo com um estudo envolvendo 221 pacientes (Sobreira et al., 2007). Apesar de existirem algumas correlações gerais de genótipo-fenótipo, a gravidade da doença, e os resultados clínicos não podem ser previstos apenas com base no genótipo (Martins et al., 2009).

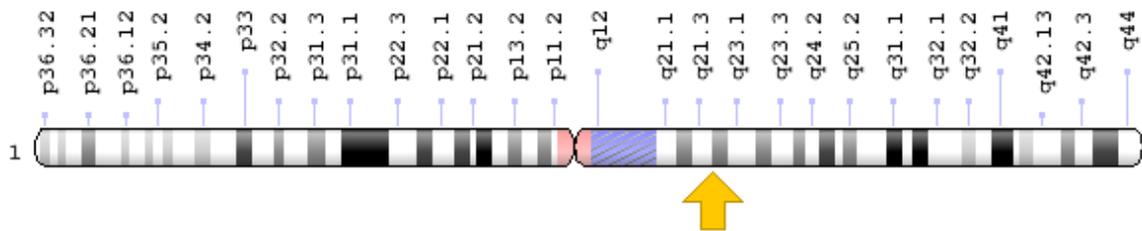
Anormalidades durante o transporte e entrega da GCCase aos lisossomos também podem levar à redução da mesma, sem que haja disfunção intrínseca à enzima, e desta forma, pode haver degradação prematura, devido ao enovelamento inadequado durante a passagem pelo retículo endoplasmático (Ron e Horowitz, 2005; Yang et al., 2015). As moléculas de *GBA* recém-sintetizadas dentro da célula, são direcionadas ao lisossomo pela interação com a proteína lisossomal integral de membrana (LIMP-2), e a entrega da mesma de fora da célula para o lisossomo ocorre devido à presença em macrófagos de um receptor específico de manose (manose-6-fosfato) (Lee et al., 2002; Grabowsky, 2012).

## 1.2 $\beta$ -GLICOSILCERAMIDASE

O gene que codifica a *GBA* humana está localizado no braço longo (q) do cromossomo 1, na posição 22 (Figura 2), apresenta 7,6 kb de tamanho e é composto de 11 éxons e 10 íntrons, podendo haver mutações em diferentes locais, ocasionando o desenvolvimento da doença de Gaucher (Sorge et al., 1985; Tsuji et al., 1986; Mehta, 2006). Sorge e colaboradores (1985) isolaram e caracterizaram um clone de cDNA relativo ao gene da *GBA* humana. Eles verificaram que o códon ATG nas posições 154-156 possibilitava a tradução da proteína com 515 aminoácidos e uma sequência de peptídeo sinal composta de 19 aminoácidos. A proteína madura continha 496 resíduos e peso molecular de 55,4kDa. No ano seguinte Tsuji e colaboradores (1986) isolaram clones de cDNA de *GBA* de uma biblioteca de hepatoma humano, e verificaram a presença de uma proteína madura de 516 resíduos com peso molecular de 57kDa.

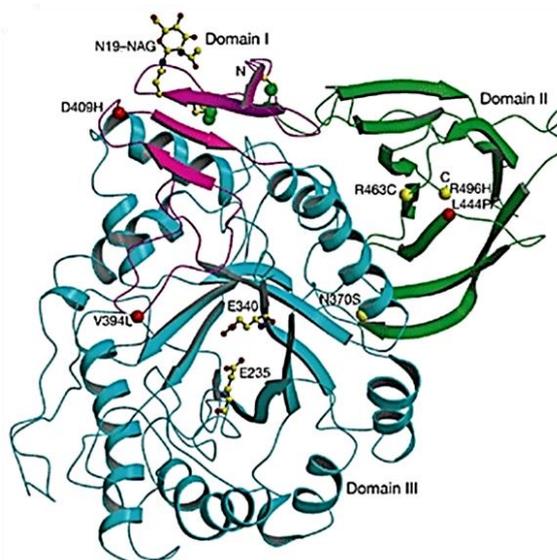
Em seguida, foi demonstrado a existência de dois códons de iniciação para a tradução da *GBA*, o que pode resultar em uma proteína madura com um peptídeo sinal composto por 39 ou 19 aminoácidos, dependendo do códon escolhido para iniciar a tradução da enzima (Sorge et al., 1987). De acordo com Sorge e colaboradores (1987) a atividade enzimática funcional de ambos os produtos de tradução foi encontrada predominantemente nos lisossomos.

O RNAm relativo à *GBA* apresenta 2324 nucleotídeos, contendo uma pequena região 5' não traduzida (166 nucleotídeos), a região codificadora (1610 nucleotídeos) e uma região 3' não traduzida (547 nucleotídeos), e o cDNA relativo à *GBA* está depositado no NCBI sob referência: NM\_000157.3.



**Figura 2.** Localização cromossômica do gene *GBA* (1q22). **Fonte:** *Genome Decoration Page/NCBI*.

A proteína apresenta dois resíduos catalíticos (E235 e E340) e cinco sítios de glicosilação, sendo quatro ativos (N19, N59, N146 e N270), e está organizada em três domínios: domínio I (resíduos 1-27 e 383-414), que contém duas pontes dissulfeto e um sítio de glicosilação (N19); domínio II (resíduos 30-75 e 431-497), que apresenta um sítio de glicosilação (N59) e o domínio III (resíduos 76-381 e 416-430), o qual contém o sítio catalítico e constitui-se por dois sítios de glicosilação (N146 e N270) (Figura 3) (Dvir et al., 2003).



**Figura 3.** Estrutura de raios-X da  $\beta$ -glucosilceramidase. O domínio I é mostrado em roxo e contém as duas pontes de dissulfeto, cujos átomos de enxofre são mostrados como círculos verdes, o domínio II é mostrado em verde. O domínio catalítico (domínio III) é mostrado em azul, bem como os resíduos do sítio ativo E235 e E340 também são evidenciados. As seis mutações mais comuns da  $\beta$ -glucosilceramidase (GlcCerase) são mostradas como círculos, com aquelas que causam predisposição para doença grave (tipos 2 e 3) em vermelho e leve (tipo 1) em amarelo. **Fonte:** Dvir et al., 2003.

Existem centenas de mutações para o gene *GBA1*, entretanto, as mutações N370S, L444P, 84GG e IVS2 representam 98% das mutações encontradas nos pacientes e, destas, a N370S e L444P possibilitam prognósticos dos sintomas (Koprivica et al., 2000). O alelo N370S não correlaciona-se a manifestações neurológicas e, portanto, está associado a DG do tipo I. Além disso, sua presença em homozigose confere quadros clínicos menos graves da doença (Beutler e Gelbart, 1996; Grabowski, 1997), sendo que parte dos indivíduos que apresentam o genótipo N370S/N370S podem se manter assintomáticos, enquanto outros com o mesmo genótipo para *GBA1* apresentam sintomas graves, relacionados à doença (Elstein et al., 2010; Huang, Zhang e Chen, 2015).

A presença de heterozigose composta do alelo N370S com as demais mutações (L444P, 84GG ou IVS2 (+1)), pode estar associada a manifestações neurológicas mais graves (Beutler e Gelbart, 1996; Grabowski, 1997), porém também já foi observada em paciente do tipo 1 (N370S/L444P) com sintomas leves da doença (Huang, Zhang e Chen, 2015); esse amplo quadro de heterogeneidade fenotípica para o mesmo genótipo nos leva a considerar que há o envolvimento de outros fatores relacionados a essas manifestações, como modificadores genéticos ou fatores ambientais. Esses modificadores podem estar relacionados com outras etapas do metabolismo da *GBA* ou mesmo com alterações pós-transcricionais que afetam a ação da enzima, seja no tráfego, ligação ou nas vias de degradação (Huang, Zhang e Chen, 2015). Goker-Alpan e colaboradores (2005) observaram que a gravidade da doença pode variar entre

pacientes portadores das mesmas mutações e Lachmann e colaboradores (2004) observaram essa mesma variabilidade entre irmãos univitelinos.

Horowitz e colaboradores (1989) descreveram a presença de um pseudogene (*GBAP*) 16 kb *downstream* do gene da *GBA1*, o que confere frequentes eventos de recombinação entre ambos. A atividade residual da GCase depende do tipo de mutação no gene que a produz e, no caso da N370S, em um heterozigoto composto, garante sua atividade residual suficiente para o catabolismo correto do glucocerebrosídeo nos neurônios (Grabowski, 1997).

No caso da mutação L444P, quando em homozigose, prediz DG neuropática, porém não é determinante para a diferenciação entre DG do tipo 2 e 3 (Koprivica, 2000), mas está altamente relacionada com quadros clínicos de doença neuropática (Beutler e Grabowski, 2001). A mutação D490H, quando em homozigose, está diretamente relacionada com envolvimento cardiovascular dos pacientes com DG (Cindik et al., 2010; Baris, Cohen e Mistry, 2014), e acredita-se que portadores de homozigose para 84GG ou IVS2+1 sejam casos de letalidade, sendo que a 84GG bem como a V394L são mutações exclusivas da população de judeus Ashkenazi (Baris, Cohen e Mistry, 2014). A mutação N370S representa 70-80% nessa mesma população de judeus e cerca de 30% na população em geral (Cindik et al., 2010).

### 1.3 TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA

A doença de Gaucher é a mais comum dentre as doenças de depósito lisossômico, e segundo dados do Ministério da Saúde, há 670 pacientes com DG em tratamento no Brasil e destes, 96% fazem uso de terapia de reposição enzimática - TRE e os outros 4% recebem o tratamento de terapia de redução do substrato - TRS (Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas, 2014). O objetivo da TRE é a substituição da enzima deficiente pela enzima funcional, enquanto que a TRS atua inibindo a formação de GlcCer, evitando assim o seu acúmulo. O Miglustate (Zavesca<sup>®</sup>, *Actelion Pharmaceuticals*), é um inibidor oral da glicosilceramida sintase, um análogo de glicose (Machaczka, et al., 2012), e geralmente é indicado quando não há uma resposta efetiva da TRE.

O tratamento de reposição enzimática, para a doença de Gaucher, foi sugerido pela primeira vez por Christian de Duve em 1964 e o primeiro ensaio clínico foi aprovado em 1991 pela *Food and Drug Administration* (FDA) (de Duve, 1964; Desnick e Schuchman, 2012). O objetivo da TRE é fornecer a enzima funcional para os tecidos mais afetados pela doença e, esta é obtida por meio de purificação de outros tecidos humanos ou por uma produção em sistemas celulares. As mesmas são desglicosiladas, expondo os seus resíduos de manose de modo a permitir a sua absorção pelos receptores dos macrófagos e a sua transferência para os

lisossomos (Goker-Alpan, 2011). A administração da enzima é realizada a cada 15 dias, porém esse tratamento não apresenta a capacidade de alcançar a barreira hematoencefálica, sendo essa terapia muitas vezes ineficaz em casos em que o sistema nervoso central é acometido (Kirkegaard, 2013).

A multinacional *Genzyme Corporation* produziu a primeira droga comercial para ser utilizada na TRE, a Alglucerase (medicamento Ceredase<sup>®</sup>), purificada de placentas humanas (Friedman e Hayes, 1993). Essa molécula foi aprovada para comercialização pela FDA em 1991, nos Estados Unidos, e projetada para uso na Terapia de Reposição Enzimática para doença de Gaucher, porém devido a sua forma de obtenção resultou em um custo muito elevado, tendo sido denominada pela mídia como a “droga mais cara do mundo”. Esse custo se deve em parte à sua fonte de origem, assumindo um rendimento de 1mg de GCase a cada 10-20kg de placenta, o que significa que eram necessários 500 a 2000kg de placenta humana por paciente a cada duas semanas (2.000 a 8.000 placentas) (Dinur et al., 1986; Cramer et al., 1996). A TRE consiste de infusões intravenosas regulares da droga, a qual suplementa a ineficiência da atividade enzimática nos pacientes (Barton et al., 1991), e seu uso foi posteriormente substituído por novas enzimas disponíveis para comercialização.

No Brasil, existem três enzimas recombinantes para o tratamento de DG sendo comercializadas atualmente. A Imiglucerase (medicamento Cerezyme<sup>®</sup>, *Genzyme Corporation*, Cambridge, MA) produzida em células murinas (CHO), a Taliglucerase- $\alpha$  (medicamento Elelyso<sup>®</sup>, *Protalix Biotherapeutics*, Carmiel, Israel) produzida em células de cenoura (Shaaltiel et al., 2012), que no caso, apresenta glicosilação específica e a Velaglucerase- $\alpha$  (VPRIV<sup>®</sup>, *Shire HGT*, Cambridge, MA), produzida usando fibroblastos humanos. A Imiglucerase obteve autorização de comercialização em 1996, e a Velaglucerase- $\alpha$  foi autorizada em 2010, enquanto a Taliglucerase estava disponível durante 2009-2011, período de escassez de Imiglucerase, por motivos de uma contaminação viral na cultura recombinante, mas não obteve uma autorização de comercialização em todos os países (Stirnemann et al., 2017), tendo sido aprovada pela FDA em maio de 2012.

Para os pacientes com DG 1 a resposta ao tratamento por TRE é efetiva, já que esse grupo possui pouco ou nenhum comprometimento no SNC. As manifestações sistêmicas da DG 3 também respondem positivamente ao tratamento por TRE, mesmo com a incapacidade da *GBA* recombinante de atravessar a barreira hematoencefálica (Sawkar et al., 2006). A administração da enzima é por via intravenosa e as doses variam de acordo com o país (Goker-Alpan, 2011) bem como de acordo com a idade do paciente e progressão da doença (Martins et al., 2009).

As recomendações do ministério da saúde (2014) são uma dose inicial de 60 U/Kg a cada 15 dias para adultos em situação de “risco” e para crianças, e como dose de manutenção a longo prazo, a dose pode ser estabelecida em 15 a 30 U/Kg (Andersson et al., 2005). Porém, é necessário observar todos os aspectos clínicos da doença, para avaliar como o indivíduo é afetado e como é a resposta ao tratamento, a fim de determinar se a dose é adequada (Grabowski et al., 2009).

A Imiglucerase é a enzima recombinante pioneira e apresenta a substituição do aminoácido arginina pela histidina (R495H), o que resultou em uma maior entrega *in vivo* da proteína na célula alvo por favorecer o reconhecimento pelos receptores de carboidratos da membrana dos macrófagos (Friedman e Hayes, 1993). A taliglucerase também apresenta a modificação R495H, além de dois aminoácidos adicionais na região N-terminal e sete aminoácidos na porção C-terminal (Shaaltiel et al., 2012).

Os sintomas relacionados à osteopenia e infiltração da medula óssea regredem progressivamente e o envolvimento de problemas ósseos é menos relatado após um período de 24 a 48 meses da terapia (Weinreb et al., 2007; Mistry et al., 2011). Geralmente há uma melhora significativa no quadro de trombocitopenia, mas quadros clínicos de esplenomegalia residual podem persistir mesmo após o início do tratamento de TRE (Stein et al., 2010). Com relação aos sintomas neurológicos, não há nenhuma evidência de reversão ou estabilização desses sintomas em pacientes tratados por TRE (Weiss et al., 2015). Apenas 2 a 14% dos pacientes desenvolveram imunogenicidade à terapia, dependendo da enzima utilizada, geralmente sem sinais clínicos (Stirnemann et al., 2017), sendo que não há critérios prévios para o uso preferencial de uma ou outra enzima disponível no mercado. A Imiglucerase é a única com autorização para o uso dos pacientes com DG 3, não sendo indicado nenhum tratamento para DG 2, dado que não há nenhuma resposta do tratamento aos sintomas neurológicos progressivos da DG tipo 2, devendo receber os devidos cuidados paliativos (Mignot et al., 2006).

De acordo com dados do Ministério da Saúde cerca de 500 pacientes com DG foram tratados no Brasil no ano de 2007, tendo sido comprados 177.280 frascos de enzima para TRE a um custo de mais de 250 milhões reais. Tendo em vista o alto custo de tratamento dos pacientes com DG e sabendo-se que a produção e comercialização da enzima encontra-se exclusivamente sob o domínio de grandes empresas internacionais, a plataforma de produção proposta neste projeto tem como objetivo desenvolver a produção otimizada da *GBA* por meio do uso do sistema lentiviral, a partir de um vetor portador do cDNA da *GBA* com códons otimizados, de maneira mais rápida e eficiente comparada à tecnologia por engenharia genética

clássica, gerando um produto com tecnologia desenvolvida em território nacional, visando a redução dos custos para o país.

Diferentes sistemas de expressão já foram utilizados para a produção de *GBA* recombinante. Sistemas baseados em leveduras (Sinclair e Choy, 2002), células de insetos (Martin et al., 1988), em células de raiz de cenoura, que foi aprovada para comercialização no ano de 2012 pela FDA (Shaaltiel et al., 2012), em plantas de tabaco (Cramer et al., 1996; Limkul et al., 2016), em células de mamíferos como CHO que também foi aprovada pela FDA para comercialização no ano de 1996, e em outros trabalhos desenvolvidos em linhagem CHO (Novo et al., 2012), além de sistemas de expressão em linhagens HEK 293 (Kim et al., 2004) como o apresentado também neste trabalho. Apesar dos altos níveis de proteína obtidos nesses sistemas, a produção em linhagens humanas ainda é uma opção atraente, dado que apresenta a capacidade de produzir proteínas mais semelhantes às sintetizadas naturalmente em humanos (Ghaderi et al., 2010).

#### 1.4 SISTEMA LENTIVIRAL

Os lentivírus pertencem a família Retroviridae, sendo o HIV, vírus da imunodeficiência adquirida, o único lentivírus patógeno da espécie humana (Merten, Hebben e Bovolenta, 2016). Os vírus dessa família são esféricos e medem de 80-120nm de diâmetro, seu genoma consiste de duas moléculas de RNA de cadeia simples de sentido positivo e apresentam estratégia replicativa única, na qual o RNA viral é transcrito reversamente em DNA de cadeia dupla, que irá integrar-se no genoma da célula (Varmus e Brown, 1989; Coffin, Hughes e Varmus, 1997). Em conjunto com as cadeias de RNA, as proteínas estruturais bem como as enzimas necessárias para a replicação formam o nucleocapsídeo e este, está dentro de um capsídeo proteico circundado por uma bicamada lipídica (Adamson e Jones, 2004), e entre a membrana e o capsídeo estão as proteínas da matriz. As glicoproteínas da superfície viral interagem com os receptores da membrana fosfolípida da célula hospedeira, o que leva a mudança conformacional na glicoproteína viral e, conseqüente fusão entre as bicamadas lipídicas, o que permite a entrada do genoma viral na célula hospedeira (Tomás et al., 2013).

Diferentes sistemas virais estão sendo desenvolvidos para uso em pesquisa com o intuito de desenvolver protocolos de terapia para o tratamento de doenças raras (Merten, Hebben e Bovolenta, 2016). O vetor adenoviral do tipo AAV1, por exemplo, foi comercializado para o tratamento da deficiência da lipoproteína lipase (Salmon, Grosios e Petry, 2014). Um tipo de vírus que tem se destacado são os vetores retrovirais, caracterizados por serem veículos eficientes para a transferência gênica em células de mamíferos dado que apresentam a

capacidade de expressão a longo prazo e se integram no genoma celular. A partir dos retrovírus, dois principais sistemas foram desenvolvidos, sendo eles, o vetor retroviral derivado do vírus da leucemia murina (MLV), e o vetor lentiviral (LV) derivado do HIV-1 (Delenda, 2004). Os LVs podem transduzir células que não estão em processo de divisão celular, sendo sua principal vantagem em comparação aos vetores oncoretrovirais (Naldini et al., 1996; Merten, Hebben e Bovolenta, 2016). Os LVs apresentam risco diminuído à mutagênese insercional em relação ao MLV, além de apresentar altos níveis de produção viral (Montini et al., 2009; Merten, Hebben e Bovolenta, 2016).

Os retrovírus dividem-se em sete gêneros (*alpha-*, *beta-*, *gamma-*, *delta-*, e *epsilon-Retroviridae*, *Spumaviridae* e *Lentiviridae*) e, entre eles, os *gamma-Retroviridae* (MLV) e o *Lentiviridae* (HIV) possuem os padrões de integração caracterizados (Poletti e Mavilio, 2018). Esses estudos mostram que os *gamma*-retrovirus possuem sítios preferências de inserção em regiões promotoras e elementos *enhancers*, associado a locais da cromatina enriquecidas em marcas epigenéticas como H3K4me1-3 e H3K27ac. Já os lentivírus possuem como sítios preferências de inserção sequências transcricionalmente ativas, se integrando sem diferenciar íntrons ou éxons, além de estar associado a regiões do genoma enriquecidas em histonas do tipo H3K36me3 (Lusic e Siciliano, 2017; Poletti e Mavilio, 2018).

Os LVs têm sido utilizados em ensaios clínicos para terapia gênica de doenças neurodegenerativas e de imunodeficiências (Merten, Hebben e Bovolenta, 2016). A síndrome de Wiskott-Aldrich, é uma imunodeficiência hereditária, que foi tratada por meio da infusão de células-tronco hematopoiéticas modificadas *ex vivo* por terapia gênica, com o uso de vetor lentiviral codificador da enzima *WASP* funcional, sendo essa a enzima deficiente nos portadores dessa doença. Como resultado dessa infusão foi observada a expressão de *WASP* como também melhora nos sintomas clínicos, e não foi observado evidência de expansões clonais por até 32 meses após a terapia gênica realizada em três pacientes (Aiuti et al., 2013).

O HIV-1 é o protótipo do sistema de vetores lentivirais (Merten, Hebben e Bovolenta, 2016), seu genoma tem entre 9-10 kb e apresenta sequências reguladoras de expressão gênica e de síntese proteica; genes que codificam proteínas reguladoras além de genes estruturais e enzimáticos, comuns a todos os retrovírus, como *gag*, *pol* e *env* (Katz e Skalka, 1994). Flaqueando o provírus retroviral estão presentes as repetições terminais longas (LTRs), as quais contêm a sequência promotora responsável por permitir a expressão gênica, as repetições *att*, importantes para a integração do provírus (Ptak et al., 2008; Fu et al., 2009).

Além dessas sequências, o vírus do HIV-1 também apresenta outros seis genes; dois genes que codificam duas proteínas reguladoras (*tat* e *rev*), e quatro genes responsáveis por

expressar proteínas acessórias (*vif*, *nef*, *vpr* e *vpu*) (Ptak et al., 2008; Fu et al., 2009). As proteínas acessórias apresentam funções que estão relacionadas a patogênese do vírus e são dispensáveis para a replicação viral *in vitro* (Tomás et al., 2013). Para a geração desses vetores lentivirais, requisitos de biossegurança devem ser considerados. Diferentes gerações desses vetores foram desenvolvidas ao longo dos anos, com o objetivo de utilizá-los em pesquisas clínicas (Merten, Hebben e Bovolenta, 2016). Para tanto, todos os genes acessórios foram removidos a partir da segunda geração de LVs e, da segunda para a terceira geração, o gene regulatório *tat* também foi removido, dado que sua função transacional é dispensável como o promotor U3 da região 3' LTR na transferência do vetor, o que pôde ser substituído pela sequência promotora constitutivamente ativa, o CMV (citomegalovírus) (Kim et al., 1998; Zufferey et al., 1998). Essas modificações levam a um sistema LV com funções baseadas nas sequências *gag-pol*, responsáveis pela codificação de proteínas estruturais e enzimas virais, baseada também no gene *rev*, que codifica um regulador pós-transcricional, todos derivados de HIV-1 e *env*, além disso, esses vetores fazem uso da glicoproteína do envelope do vírus da estomatite vesicular (VSV-G), por apresentar alta estabilidade e amplo espectro transducional (Merten, Hebben e Bovolenta, 2016).

No processo de transdução do LV de terceira geração, o material genético a ser transferido para a célula-alvo é o transgene, o qual tem-se o interesse de ser expresso. Esse é flanqueado por elementos necessários ao encapsulamento, e é retrotranscrito e em seguida integrado no genoma da célula hospedeira (Zufferey et al., 1998). Além disso, LVs auto-inativantes perderam também a capacidade de transcrever a sequência LTR viral, o que minimiza o risco de recombinação e interferência da sequência promotora (Tomás et al., 2013). Outras modificações, visando aumentar a biossegurança desses LVs, relaciona-se à remoção de homologias de sequências residuais existente entre o genoma do vetor e construção da sequência *gag-pol*, por meio da otimização de códons, o que reduz cerca de 100 vezes a frequência de possíveis eventos de recombinação (Wagner et al., 2000; Merten, Hebben e Bovolenta, 2016).

Kim e colaboradores (2004) transduziram cultura de fibroblastos, derivados de pacientes com DG, utilizando vetores lentivirais recombinantes contendo a sequência de cDNA do gene da *GBA*. Altos níveis de expressão de GCCase foram produzidos nessa cultura e a administração do vetor lentiviral em camundongos também resultou em altos níveis de expressão de GCCase, que persistiram na maioria dos órgãos ao longo de quatro meses.

## 1.5 CÓDONS SINÔNIMOS

A presença de códons sinônimos (do inglês, *codon bias*) é uma das características do código genético, ou seja, o código é redundante. Diferentes códons podem codificar um mesmo resíduo de aminoácido, o que leva a formação de diferentes sequências de nucleotídeos, mas que expressam o mesmo produto proteico (Zuckerlandl e Pauling, 1965). O uso de códons preferenciais já foi observado em todos os grandes grupos e essa preferência entre os códons, pode variar entre espécies próximas, como também entre genes (Grantham et al., 1980). Inicialmente acreditava-se que essas mutações, uma vez que não alteram a sequência do polipeptídeo, eram neutras, ou seja, não causavam efeito sobre a aptidão ou função celular dos organismos (King e Jukes, 1969; Plotkin e Kudla, 2011). Entretanto, estudos recentes têm mostrado que a variação de sequências devido à redundância do código genético, bem como as múltiplas possibilidades de transcrição, pode possibilitar a ação da seleção natural (Sharp et al., 1995; Plotkin e Kudla, 2011).

A preferência no uso de códons sinônimos está relacionada, na maior parte das vezes, com a eficiência translacional, o que significa dizer que há a escolha dos códons que são mais rapidamente traduzidos, reduzindo assim, o tempo e o “esforço” despendido no processo (Sharp et al., 2005). Essa preferência relaciona-se também com a abundância dos diferentes RNAt presentes na célula, o que também possibilita que a tradução aconteça mais rapidamente frente às sequências que estão em menor frequência no meio celular (Duret, 2000). A diferença nas frequências com que os códons sinônimos vêm sendo utilizados nos processos celulares dos diferentes organismos é reconhecida como uma área crucial de estudo, uma vez que essas substituições estão intimamente relacionadas com os resultados de expressão gênica e função celular (Plotkin e Kudla, 2011).

Uma análise do nível de expressão das proteínas L1 e L2 do capsídeo de papilomavírus em células Cos-1, utilizando códons preferenciais de papilomavírus *versus* os de mamíferos, mostrou que o uso de códons preferenciais de mamíferos induz um aumento de quase 1000 vezes das proteínas do capsídeo na célula hospedeira (Zhou et al., 1999). Desde que foi observada a possibilidade de haver vantagem seletiva de um códon sinônimo sobre outro, e de verificar que esse resultado está vinculado ao conjunto de genes de RNAt no genoma, modelos estão sendo desenhados a fim de compreender a relação entre o uso de códons preferenciais dependentes de seleção, mutação e deriva (Li, 1987; Bulmer, 1991; Higgs e Han, 2008), sendo esses desafios vigentes dessa área de estudo.

Acredita-se que a relação entre o uso de códons preferenciais e o conjunto de genes de RNAt disponíveis seja uma questão de coevolução molecular, em que haja um equilíbrio entre

o uso de códons sinônimos disponíveis e a velocidade em que o códon de escolha é traduzido. Entretanto, o número de cópias de RNAt disponível pode mudar devido a mutações no anticódon ou como consequência de deleções e duplicações gênicas. Desta forma, pode-se observar um processo de evolução do número de cópias em relação à correspondência no uso dos códons sinônimos e, sendo assim, é esperado encontrar casos onde haja um processo de coevolução, não havendo diminuição na eficiência da tradução, sem que haja mudanças no uso dos códons e na escolha do RNAt (Higgs e Han, 2008). Em leveduras foi identificado dois grupos de genes que apresentavam padrões diferentes na preferência de códons sinônimos e, esses padrões mostraram significado biológico, dado que foi observado genes diferencialmente expressos, ou seja, com altos e baixos níveis de expressão (Sharp, Tuohy e Mosurski, 1986; Higgs e Han, 2008).

Em *Drosophila* o uso de códons preferenciais também foi relatado e mostrou-se efetivo em níveis do desenvolvimento onde há alta taxa de crescimento e, portanto, níveis de expressão gênica aumentados (Vicario et al., 2008), e em *Escherichia coli* a taxa e precisão transducional *in vivo* também é afetada pelo uso de códons preferenciais (Navon e Pilpel, 2011). Em leveduras, *E. coli* como também em *Bacillus subtilis*, foram identificados mais de dois conjuntos padrões de uso de códons sinônimos e, apenas um desses *clusters* em cada uma das espécies foi relacionado à seleção translacional (Bailly-Bechet et al., 2006). Em genomas bacterianos já foram identificados mais de 120 genes de RNAt, porém, o número típico desses genes em bactérias é de cerca de 50. Acredita-se que nesse grupo de organismos o elevado número de cópias de RNAt seja em resposta à seleção translacional e que, devido a sua rápida multiplicação, o tempo despendido durante o processo de tradução é um fator limitante do processo de divisão (Higgs e Han, 2008).

Sabe-se que alguns RNAt apresentam a capacidade de ligar-se a códons alternativos e não apenas com a sua sequência complementar. Essa característica se deve a um tipo fraco de pareamento na extremidade 3' do códon e na 5' do anticódon. Atualmente esse processo já é conhecido e é chamado de oscilação (do inglês, *wobble*). Pela regra da oscilação é sabido que G na extremidade 5' do anticódon pareia-se com C ou U na extremidade 3' do códon; C somente com G; A somente com U; e U com A ou G (Crick, 1966). Há casos em que já foram observados que existe um único RNAt com uma base U na posição de oscilação, que pode parear tanto com A quanto com G. Nessa situação foi demonstrado haver uma preferência pelo códon A, dado que a ligação com A acontece mais rapidamente do que com G (Higgs e Han, 2008). Entretanto, há situações em que a posição oscilante, em um outro RNAt, era a C e, neste caso, a tradução de sequência com a base G na extremidade 3' do anticódon será traduzida mais rapidamente

em relação a A, dado que ambos emparelham com o códon G, mas apenas o RNAt *wobble-U* emparelha-se com A (Sorensen e Pedersen, 1991).

Um estudo feito com espécies de vertebrados, mediu o que eles denominaram de “*Codon Adaptation Index*” - CAI, o que representa o peso geométrico do códon específico sobre todo o peso geométrico do genoma, e desta maneira, encontraram os CAIs para cada códon entre conjuntos separados de organismos, todas espécies de vertebrados, como humanos, peixes-zebra, ratos e galinhas. Os resultados indicaram que os códons com os maiores CAIs representavam o códon preferido, e que estes eram códons ricos em guanina e citosina. Um exemplo interessante acontece com a leucina, que apresenta seis códons, sendo que os dois códons que iniciaram com uracila representaram uma porcentagem muito menor do que os códons que começaram com a citosina e, acredita-se que haja uma tendência para a guanina e a citosina no genoma e que as mesmas são mantidas constantes em todos os genomas (Nabiyouni, Prakash e Fedorov, 2013).

A vantagem do uso de códons preferenciais em trabalhos experimentais ainda é incerta e, portanto, uma área de grande visibilidade. Vogel e colaboradores (2010) apresentaram uma caracterização abrangente de determinantes da abundância de proteínas humanas e, para isso, foram realizadas medições em larga escala de concentrações absolutas de proteína e RNAm em linhagem Daoy (linhagem de meduloblastoma), para mais de 1000 genes. O grupo verificou que há uma razão de cerca de 1/3 (29%) de abundância proteína/RNAm. Os autores defendem que a contribuição da degradação proteica é tão importante quanto a contribuição da transcrição e estabilidade do RNAm para a variação da abundância dos produtos proteicos finais, o que os levaram a repensar o fato de que o primeiro passo para a expressão, no caso a transcrição, seja de fato o principal alvo da regulação.

O porquê dessa grande variação ainda é especulativo, e há autores que atribuem essa diferença ao comprimento da sequência de codificação, sugerindo que transcritos mais longos são menos estáveis (Feng e Niu, 2007) e demoram mais iniciar o processo de tradução (Arava et al., 2005). Além disso, um outro conceito discutido é o de que a adaptação do códon não representa necessariamente níveis mais elevados de síntese proteica (Welch et al., 2009) como também, o fato de que variadas taxas de degradação proteica podem estar ocorrendo (Vogel et al., 2010).

Sabe-se que os códons sinônimos estão relacionados com a modulação da produção e dobramento proteico, entretanto, o mecanismo que agrega o conceito do uso de códons sinônimos à homeostase proteica ainda é desconhecido. Foi demonstrado que variantes de códons sinônimos no gene que codifica a proteína  $\beta$ -gama cristalina, uma das constituintes do

olho de mamíferos, promove alterações na estrutura tridimensional da mesma, o que levou a resistência à ação da protease, *in vitro* (Buhr et al., 2016). Substituições de códons sinônimos mostraram também alterar o dobramento da proteína cotranslacional e essa análise, por meio de modelagem computacional, conduziu os autores do trabalho à ideia de que a evolução pode ter moldado o uso de códons sinônimos nos genomas dos organismos, em parte, para aumentar a quantidade de proteína nascente (Sharma, Bukau e O'Brien, 2016).

Hu e colaboradores (2013) realizaram duas otimizações independentes no gene da queratinase A de *Bacillus licheniformis* S90 e expressou essas diferentes construções em *Pichia pastoris*, bem como uma construção com a sequência original. Os resultados mostraram que foi possível a otimização da sequência da queratinase A em *P. pastoris* e a atividade biológica foi de 293 e 324 U/mL para as sequências otimizadas enquanto que a expressão da sequência original obteve atividade da ordem de 195 U/mL. Um outro estudo, também com *P. pastoris* avaliou o impacto do uso de códons sinônimos na expressão de proteínas heterólogas, no caso *GBA*, e observaram um aumento de 10,6 vezes mais atividade biológica, após o uso de códons preferenciais em um fragmento de 186 pb do gene da *GBA* (Sinclair e Choy, 2002).

Como já foi dito anteriormente, essas mutações ditas silenciosas, são conhecidas por apresentarem a capacidade de causar alterações na expressão, conformação e função proteica. Estudos de associação genômica ampla – GWASs (do inglês, *genome-wide association studies*), tem mostrado uma forte relação entre SNPs (do inglês, *single-nucleotide polymorphism*) sinônimos para o risco de doenças humanas (Zubén e Chava, 2011). Acredita-se que esses SNPs sinônimos podem afetar a estabilidade do RNAm e conseqüentemente, a expressão proteica e atividade enzimática (Nackley et al., 2006), o que pode levar a conseqüências clínicas (Kimchi-Sarfaty et al., 2007). A manipulação das sequências codificadoras é uma das propostas de muitos trabalhos que se iniciaram no final do século passado e que vêm se intensificando no presente. A busca de respostas frente a ação dessas mudanças sinônimas no código genético faz parte dessa área de estudo ainda tão polêmica e desconhecida. A proposta desenvolvida neste estudo foi creditada com base em estudos publicados e com o intuito de obter maiores níveis de produção enzimática *in vitro*, visto que o interesse futuro dessa linha de pesquisa é a obtenção da proteína purificada, para possível terapia de reposição enzimática para a doença de Gaucher, com desenvolvimento total em território nacional.

## 2 JUSTIFICATIVA

O tratamento dos pacientes de Gaucher representa um alto custo, o que pode limitar o número de pacientes tratados, principalmente em países subdesenvolvidos (Jmoudiak e Futerman, 2005). No Brasil há 670 pacientes em tratamento assistidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) com o uso de medicamentos adquiridos pelo governo federal e distribuídos pelas secretarias estaduais de saúde (Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas, 2014). Até o momento, o governo brasileiro apresenta dependência total de produtos importados para o tratamento da doença de Gaucher, o que resulta em um elevado custo para o país. O medicamento é disponibilizado aos estados pelo Ministério da Saúde, por meio de aquisição centralizada, seguindo a Portaria GM no 2.577/06. É estabelecida pela mesma uma programação anual e trimestral, sujeita à aprovação. No ano de 2009, conforme dados fornecidos pelos estados ao Ministério, o gasto chegou a US\$ 84 milhões apenas com a compra do medicamento. Diante disso, espera-se que o desenvolvimento de sistemas de produção mais eficientes associados à prática atual do tratamento personalizado reduza a dose da enzima administrada e, como consequência, permita a redução do custo da terapia, além do desenvolvimento do medicamento em território nacional.

A forma de produção proposta neste projeto tem como objetivo desenvolver uma plataforma otimizada de produção da *GBA* por meio do vetor lentiviral, a partir de um vetor portador do cDNA da *GBA* com códons otimizados, de maneira mais rápida e eficiente comparada à tecnologia por engenharia genética clássica.

O uso do sistema lentiviral com sequências específicas que aumentam a estabilidade do RNAm (WPRE), como também de múltiplos ciclos de transdução, permitiu a obtenção de múltiplas cópias do gene *GBA* no genoma da célula hospedeira. Esta plataforma agrega diferentes componentes de um sistema de produção do biofármaco em células humanas, para a doença de Gaucher, que representa o protótipo das doenças de erro inato do metabolismo. A implantação desta estratégia de produção poderá ser utilizada como protótipo para o desenvolvimento de biofármacos para outras doenças de erro inato do metabolismo que, até o momento, não apresentam opções terapêuticas. O trabalho desenvolvido será continuado no laboratório, a fim de obter a proteína purificada produzida pelas linhagens aqui geradas, buscando obter um produto ao final do projeto que está sendo desenvolvido no laboratório de Erros Inatos do Metabolismo – FMRP.

### **3 HIPÓTESE**

A agregação do uso de códons sinônimos, engenharia genética e sistema lentiviral permitirá a geração de uma nova molécula recombinante da glicosiceramidase humana biologicamente ativa *in vitro*.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Gerar uma linhagem celular humana portadora do cDNA da *GBA* humana com códons sinônimos e com produção estável da *GBA* biologicamente ativa. Como controle, gerar uma linhagem celular portadora do cDNA da *GBA* humana com os códons originais.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

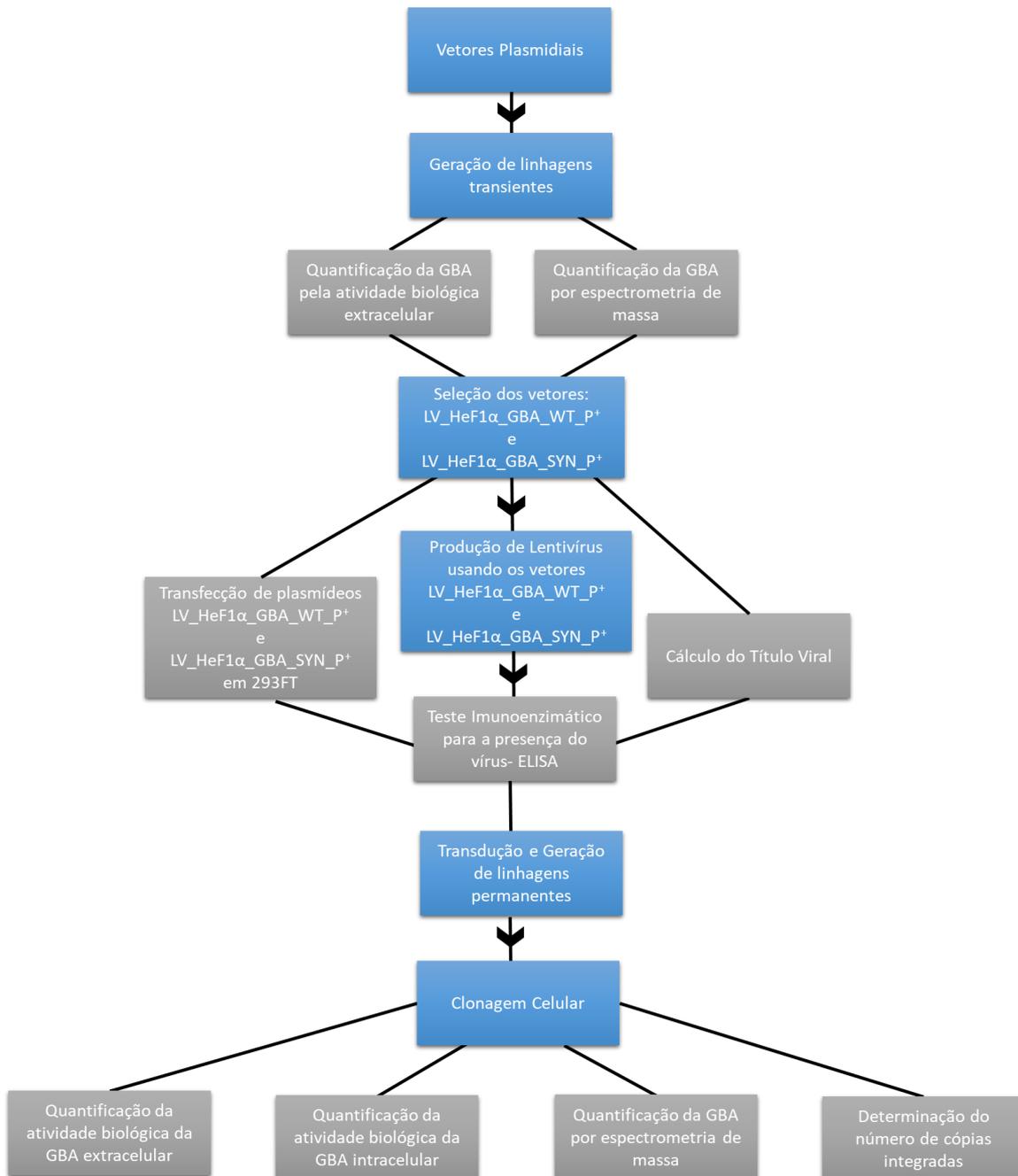
- (1) Gerar quatro linhagens, (293FT/CMV\_GBA\_WT; 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT; 293FT/CMV\_GBA\_SYN; 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN), com produção transiente da enzima GCCase e uma linhagem controle transfectada com vetor vazio (293FT/MOCK);
- (2) Avaliar quais das linhagens geradas obtiveram os melhores resultados, a fim de selecionar os plasmídeos mais promissores para geração das linhagens com produção permanente da GCCase, por meio de análises de atividade biológica, e quantificação por espectrometria de massa do sobrenadante celular;
- (3) Avaliar a funcionalidade dos vetores lentivirais pLV\_B4B2\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_UbC\_Puro e pLV\_B4B2\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_Mut\_UbC\_Puro em termos de capacidade de produção de partículas virais;
- (4) Gerar duas linhagens celulares humanas (293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT; 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN) com produção permanente da enzima GCCase, por meio do sistema lentiviral;
- (5) Determinar os níveis de atividade biológica de GCCase nas linhagens geradas e comparar os resultados obtidos com o controle, a linhagem celular humana 293FT virgem, por análise de atividade biológica;
- (6) Realizar a clonagem celular das linhagens geradas e identificar o clone com níveis mais elevados de atividade da GCCase no sobrenadante celular;
- (7) Determinar o número de cópias do cDNA da *GBA* com os códons originais e com os códons sinônimos, nas linhagens geradas (293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT; 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN), após seis ciclos de transdução das populações mistas, bem como dos clones com os níveis mais elevados de atividade da GCCase extracelular;
- (8) Comparar os níveis da enzima lisossomal recombinante secretada e intracelular das populações celulares com produção estável de GCCase e dos clones celulares mais produtivos;
- (9) Quantificar a enzima recombinante lisossomal  $\beta$ -glicosilseramidase presente no meio extra e intracelular dos cultivos das linhagens celulares humanas com produção transiente e das

linhagens celulares com produção estável (populações mistas e dos melhores clones), pela técnica de espectrometria de massa.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Primeiramente os plasmídeos foram avaliados quanto à sua funcionalidade e capacidade de produção da enzima GCCase, por meio de transfecção e atividade biológica transiente no sobrenadante celular, por ensaio fluorimétrico e quantificação da GCCase extracelular, pela técnica de espectrometria de massa. Foram avaliadas a atividade biológica e quantificação da GCCase sob o controle de dois promotores: CMV e HeF1 $\alpha$ . A partir dos resultados obtidos, os plasmídeos que apresentavam a sequência de cDNA para *GBA*, selvagem e otimizada, sob o controle do promotor HeF1 $\alpha$ , foram selecionados para geração das linhagens com produção permanente da enzima, uma vez que apresentaram os resultados mais promissores. Buscando alcançar esse objetivo e com o intuito de obter níveis mais elevados de atividade da GCCase, foram produzidos os lentivírus com a sequência da enzima selvagem e otimizada e realizados seis ciclos de transdução com MOI (*multiplicity of infection*) entre 30-60. Em seguida foi realizada a clonagem a partir das populações mistas, a fim de obter uma população homogênea com níveis mais elevados da enzima GCCase. Análises de atividade intracelular também foram realizadas. Após a análise de atividade biológica, foi calculado o número de cópias do cDNA das sequências da *GBA* selvagem e otimizada das populações mistas e dos clones mais promissores. Uma última análise foi a quantificação da *GBA* extra e intracelular por espectrometria de massa. As principais etapas desse trabalho estão resumidas na Figura 4.



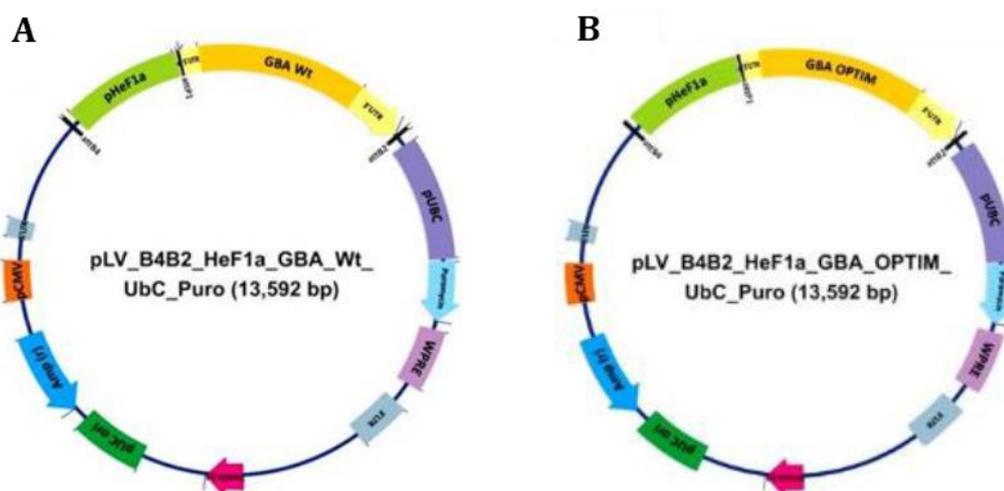
**Figura 4.** Fluxograma resumido das etapas desenvolvidas nesse trabalho.

## 5.2 LINHAGEM CELULAR HUMANA 293FT

A linhagem celular 293FT (Life Technologies/ Invitrogen™ - USA) é uma linhagem derivada da linhagem celular 293-T, adequada para a produção lentiviral (Naldini et al., 1996). A linhagem 293-T é uma linhagem permanente estabelecida a partir de rim humano, transformada com adenovírus humano tipo 5 (Graham et al., 1977). A expressão do gene adenoviral E1A permite a transativação de promotores virais, que possibilitam que haja níveis mais elevados de produção de proteína, o que torna essa linhagem adequada aos objetivos propostos nesse projeto.

### 5.3 VETORES PLASMIDIAIS

Os plasmídeos lentivirais utilizados nesse estudo foram derivados do plasmídeo de destino pDEST\_R4\_R2 gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ron Weiss - Diretor do Centro de Biologia Sintética do Departamento de Engenharia Biológica do *Massachusetts Institute of Technology* – MIT, Cambridge, MA, USA (Guye et al., 2013). A construção dos mesmos foi desenvolvida em seu laboratório sob a responsabilidade da Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes e contou com o auxílio da Dra. Velia Siciliano, como parte da colaboração obtida por meio da chamada FAPESP-MIT Processo Número 2013/50764-7 que permitiu a concretização dessa parceria, de acordo com o apresentado na Figura 5.



**Figura 5.** Desenho esquemático dos vetores plasmidiais desenvolvidos para a geração das linhagens com produção permanente da GCase. (A) Plasmídeo portador da sequência de cDNA referente a *GBA* com códons originais; (B) Plasmídeo portador da sequência de cDNA da *GBA* com códons sinônimos.

#### 5.3.1 Obtenção dos Vetores Plasmidiais

##### 5.3.1.1 Transformação Bacteriana

Foram adicionados 20ng de DNA plasmidial à 100µL de suspensão de células bacterianas competentes (DH5α) previamente preparadas. A reação foi mantida em gelo por 30 minutos e posteriormente foi submetida ao choque térmico de 42°C por 30 segundos e mantida novamente no gelo por mais 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200µL de meio SOC, composto de meio SOB (*Super Optimal Broth*) (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>) acrescido de 20mM de glicose, pH=7,0, à preparação, que então foi incubada por 1h a 37°C sob agitação a 180rpm. Depois, foram plaqueados 100µl do crescido em placa contendo LB ágar 35g/L (Difco™ LB Agar Lennox) e

carbenicilina dissódica (Sigma-Aldrich®) (100mg/mL) para crescimento apenas das bactérias transformadas. As placas foram mantidas em estufa a 37°C, *overnight* (12-16h), e armazenadas em geladeira. Com o intuito de manter as bactérias transformadas no laboratório, foram preparados estoques a partir de 300µL do crescido bacteriano acrescido de 300µL de glicerol a 70%. O tubo foi homogeneizado por inversão e armazenado imediatamente em nitrogênio líquido.

### 5.3.1.2 Midi-preparação de DNA plasmidial

Uma colônia isolada foi inoculada em 30mL de meio Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani) (25g/L), contendo 30µL de antibiótico (carbenicilina) na concentração de 100mg/mL, e mantida em estufa a 37°C a 180rpm, *overnight*. No dia seguinte foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando o kit QIAGEN® *Plasmid Plus Midi*, para um volume final de 150µL por extração, segundo as recomendações do fabricante. O DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 da Thermo Fisher Scientific.

Para verificar a presença e integridade do DNA plasmidial foi realizada eletroforese em gel de Agarose (*UltraPure™ Agarose*, da Life Technologies) a 1% preparado com *Syber Safer Green®* da Invitrogen™ em TAE 1x (40mM de Tris HCl, 20mM de ácido acético, 1mM de EDTA, pH=8,0).

Foi preparado um *mix* contendo 400ng de DNA plasmidial, 2µL de *loading buffer* (Glicerol (50%), Azul de Bromofenol (0,125%), Xileno Cianol (0,125%) pH=8,0) e água Milli-Q para um volume final de 7µL por poço. A corrida foi realizada a 100 volts por 45 minutos. O marcador referência utilizado foi o λDNA/Hind III da Ambion® [0,5mg/mL]. Os géis foram fotodocumentados no equipamento *ImageQuant™* LAS 500 da GE Healthcare Life Sciences.

## 5.4 CULTIVO E EXPANSÃO DA LINHAGEM CELULAR HUMANA 293FT

Um criotubo contendo  $2 \times 10^6$  células da linhagem 293FT foi descongelado em banho-maria a 37°C, e completado com meio DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) da Gibco® suplementado com 10% de soro bovino fetal – *Hyclone™ Fetal Bovine Serum* (GE Healthcare Life Sciences) e 1% de antibiótico, penicilina e estreptomicina da Gibco™ (*Life Technologies*), para um volume final de 5mL. O soro foi previamente inativado a 56°C por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 1200rpm, a 10°C, por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* celular foi ressuspenso em meio DMEM (10% SBF, 1% antibiótico), em seguida foi repetido o processo. As células foram contadas para verificar a viabilidade do material descongelado e expandidas em garrafas de 75 cm<sup>3</sup>. Após

atingir uma confluência entre 70-90%, a garrafa foi tripsinizada (0,5% *Trypsin*-EDTA (10x), da Gibco®), as células foram novamente contadas e utilizadas nos experimentos. O material excedente foi congelado, mantendo-se cerca de  $2 \times 10^6$  células por criotubo. Após a contagem, o volume restante foi novamente centrifugado e o *pellet* ressuspensionado em solução de congelamento [9% SBF + 1% DMSO (Dimetilsulfóxido 10%, da Sigma-Aldrich)] e mantido em gelo até o momento de armazenamento, em *freezer* -80°C. Durante o cultivo a linhagem foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

## 5.5 GERAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES HUMANAS COM PRODUÇÃO TRANSIENTE DA GC<sub>ase</sub>

Para avaliar a funcionalidade dos plasmídeos gerados foi realizado um experimento de transfecção para análise da atividade biológica transiente da GC<sub>ase</sub> no sobrenadante da linhagem 293FT virgem transfectada com os vetores plasmidiais, sendo eles: pLV\_B4B2\_CMV\_GBA\_WT\_UbC\_Puro, pLV\_B4B2\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_UbC\_Puro, pLV\_B4B2\_CMV\_GBA\_Mut\_UbC\_Puro, pLV\_B4B2\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_Mut\_UbC\_Puro e o vetor vazio (Mock) que serviu de controle do experimento.

Esse experimento foi realizado em placa de 6 poços a partir de  $1 \times 10^5$  células/poço. As transfecções foram realizadas quando a cultura de células atingiu uma confluência entre 50-70%, cerca de 48 horas após o plaqueamento. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) da Gibco® suplementado com 10% de soro bovino fetal da Hyclone® e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina da Gibco®. A transfecção foi realizada com o reagente *Attractene transfection reagent* (Qiagen inc, CA, USA), segundo especificações do fabricante. Para cada poço foram utilizados 1,5 $\mu$ g de DNA plasmidial e completou-se com meio de cultura para um volume final de 100 $\mu$ L, em seguida acrescentou-se 4,5 $\mu$ L do reagente e esperou-se 12 minutos. Depois, esse *mix* foi gotejado sobre as células. O meio de cultura foi trocado antes da transfecção e 6 horas após a transfecção por meio DMEM sem a adição de SBF, apenas com antibiótico (1%). Antes de trocar o meio, os poços foram lavados com PBS (*Phosphate-buffered saline*) 1x. O sobrenadante foi coletado 48 horas após a transfecção e centrifugado a 1500rpm, 10°C por 5 minutos para remoção dos restos de células mortas. Em seguida, foi armazenado em *freezer* -80°C. A atividade biológica por ensaio fluorimétrico foi realizada de maneira semelhante para a produção transiente e permanente da GC<sub>ase</sub> e será descrita posteriormente.

## 5.6 GERAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES HUMANAS COM PRODUÇÃO ESTÁVEL DA GCase

### 5.6.1 Produção Lentiviral por meio de Transfecção

Os ensaios de transfecção foram realizados com o plasmídeo de empacotamento (pCMV $\Delta$ R8.91), o plasmídeo responsável pela formação do envelope viral (pCMV-VSV-G) e o plasmídeo portador do cDNA da enzima GCase. Foram realizadas duas transfecções, uma para gerar o lentivírus portador da sequência original e outra para a produção do lentivírus portador da sequência otimizada da glicosilceramidase. Para produção de cada vírus, foram preparadas 5 placas de 145mm com  $2 \times 10^6$  células/placa. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) da Gibco<sup>®</sup> suplementado com 10% de soro bovino fetal da Hyclone<sup>®</sup> e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina da Gibco<sup>®</sup>.

A transfecção foi realizada após 48h (~50% de confluência) e o meio de cultura foi previamente trocado, totalizando 12mL por placa. Os ensaios de transfecção foram realizados utilizando o reagente de transfecção *Lipofectamine*<sup>®</sup> 3000 *Transfection Reagent*, da Thermo Fisher Scientific, sendo que para cada placa foi preparado um ensaio contendo 6,5 $\mu$ g do plasmídeo pCMV $\Delta$ R8.91; 3,2 $\mu$ g do pCMV-VSV-G e 12 $\mu$ g do plasmídeo portador do cDNA de interesse. Nesse ensaio foi acrescentado 44,6 $\mu$ L do reagente P3000 e 66,9 $\mu$ L do reagente *Lipofectamine* 3000 e completado com meio Opti-MEM (*Reduced Serum Media*) da Gibco<sup>®</sup> para um volume final de 200 $\mu$ L. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, o material foi gotejado sobre a cultura de células. Foi coletado o sobrenadante das células 48h e 72h após a transfecção, com o intuito de obter o maior número possível de partículas virais. O sobrenadante coletado das 5 placas, 48 horas e 72 horas após a transfecção, foi centrifugado por 5 minutos, 10°C, 1500rpm para separação de *debris* celulares, totalizando um volume final de 120mL de sobrenadante, e armazenado em geladeira a 4°C até o dia seguinte, para realização do teste imunoenzimático e posterior concentração.

### 5.6.2 Ensaio Imunoenzimático - ELISA

Para confirmar a presença de lentivírus no sobrenadante celular, uma alíquota do mesmo foi submetida ao teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Essa análise permite detectar a presença do antígeno da cápsula viral P24, e foi realizada no Laboratório de Sorologia da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP).

### 5.6.3 Concentração do Sobrenadante Lentiviral

O sobrenadante celular contendo as partículas lentivirais foi centrifugado em “colchão” de sacarose 20%, a 25000rpm, 4°C por 2 horas, em ultracentrífuga OPTIMA™ XL 100K Ultracentrifuge (SW 28 Beckman rotor), como descrito por Kurtner e colaboradores (2009). A solução de sacarose foi previamente preparada contendo 20g de sacarose, 1mM de EDTA, 100mM NaCl, 20mM HEPES, e completada para um volume final de 100mL com água Milli-Q. O pH da solução foi ajustado para 7,2 e a mesma foi filtrada em filtro com membrana de PVDF (Fluoreto de polivinilideno hidrofílico) de 0,22µm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram invertidos sobre papel toalha por cerca de 10 minutos, até que os mesmos estivessem bem secos. Posteriormente, cada *pellet* lentiviral foi ressuspensionado em 200µL de PBS 1x e estocado *overnight* a 4°C. No dia seguinte, foram utilizados os 200µL de PBS 1x para ressuspender o *pellet* lentiviral presente em cada tubo e ao final, todas as alíquotas foram misturadas, a fim de obtermos um concentrado viral homogêneo. O volume final do concentrado viral foi de 800µL, o que significa que o sobrenadante contendo as partículas lentivirais, foi concentrado cerca de 150 vezes. Em seguida foram feitas alíquotas de 50µL e estocadas em *freezer* -80°C.

### 5.6.4 Cálculo do Título Viral

Para o cálculo do título do concentrado viral referente à cada construção plasmidial, foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células 293FT em placa de 6 poços para o vírus com a sequência da *GBA* selvagem, como também para o vírus com a sequência da *GBA* otimizada. Após 8 horas de cultivo, foi adicionado o concentrado viral nos volumes de 2µL, 5µL e 10µL em 6 dos 8 poços acima mencionados e 2 poços apenas com a célula virgem, para realização da curva padrão referente ao gene endógeno. Visando aumentar a eficiência de transdução, foi adicionado o reagente *Hexadimethrine Bromide (Polybrene®)* - Sigma-Aldrich) na concentração de 6µg/mL, dado que o mesmo se liga às superfícies celulares e neutraliza a carga superficial, permitindo a entrada das partículas virais na célula. As células foram centrifugadas a 1200rpm por 40 minutos a 22°C. Após 48 horas, o DNA genômico foi extraído com o *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, e eluído em um volume final de 100uL.

### 5.6.4.1 Padronização dos *Primers*

A reação de *qPCR* para cálculo do título viral foi realizada pelo sistema TaqMan™ da Applied Biosystems. Para o gene LTR (*long terminal repeat*) foi realizado um ensaio customizado, ou seja, formado por um par de *primers* e a sonda separadamente. Desta forma, fez-se necessário o teste da concentração ideal de *primers*. Para este objetivo, o par de *primers* foi diluído e testado nas seguintes concentrações: 120nM, 80nM, 40nM, 30nM e 20nM, mantendo a concentração da sonda fixa em 100nM. A escolha da concentração ideal para testar a eficiência foi baseada em critérios pré-estabelecidos pelo protocolo de *qPCR real-time*: (1) ausência de amplificação no controle negativo, (2) Ct (*cycle threshold*) entre 20-25, (3) ausência de amplificações inespecíficas ou formação de dímeros de *primers*. A amostra utilizada para gerar a curva padrão, necessária para testar a eficiência do par de *primers* mais sonda (ensaio customizado) foi a mesma para a qual o *primer* seria utilizado posteriormente (DNA plasmidial digerido e purificado) a partir de  $3 \times 10^5$  cópias do gene em uma diluição seriada de 1:10 até o total de 30 cópias. A seguir são apresentados os *primers* e sonda utilizados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sonda inventoriada para a  $\beta$ -actina. Par de *primers* e sonda para o gene LTR, utilizados para cálculo do título viral.

Gene-alvo	Sonda Inventoriada (1) <i>Primer</i> Sense (2) Anti-sense (3) Sonda (4)
$\beta$ -actina	(1) Hs03023880_g1
LTR	(2) 5' GCCCGAACAGGGACTTGA 3' (3) 5' CGAGTCCTGCGTCGAGAGA 3' (4) 5' FAM AGCGAAAGGGAAACC MGB 3'

Os resultados foram conforme o esperado, e os valores de eficiência obtidos ficaram entre o aceitável (90-110%), porém como a própria placa do título viral apresenta os valores de eficiência de acordo com a quantificação absoluta obtida pelas curvas padrão do endógeno ( $\beta$ -actina) e do gene-alvo LTR são apresentados os valores de eficiência obtidos na placa do título (Tabela 2).

**Tabela 2.** Eficiência dos *primers* utilizados na *qPCR* do cálculo do título viral referente às sequências de cDNA da *GBA* selvagem e otimizada.

cDNA	Gene-alvo	Slope	Y-Inter	R <sup>2</sup>	Eficiência
<i>GBA</i> selvagem	$\beta$ -actina	-3,499	35,815	0,997	93,124
	LTR	-3,294	39,384	0,954	101,187
<i>GBA</i> otimizada	$\beta$ -actina	-3,171	34,237	0,996	106,723
	LTR	-3,189	39,806	0,98	105,863

#### 5.6.4.2 Linearização e Purificação dos Vetores Plasmidiais

A linearização dos vetores plasmidiais circulares foi feita por meio do uso da enzima de restrição de corte único (Hpa1 – *New England Biolabs*<sup>®</sup> Inc. – USA). A digestão plasmidial foi feita a partir de 1µg do plasmídeo, 2µL da enzima Hpa1 (5000 unidades/mL) e 5µL de tampão *CutSmart* (10x) completados com água Milli-Q para um volume final de 50µL. A digestão foi realizada em banho-maria a 37°C, por 2 horas. Em seguida, os plasmídeos foram purificados com o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare Life Sciences – UK) de acordo com as orientações do fabricante.

Para verificar a presença e integridade do DNA plasmidial, foi realizada eletroforese em gel de Agarose (*UltraPure*<sup>™</sup> Agarose, da Life Technologies) a 1% preparado com *Syber Safer Green*<sup>®</sup> da Invitrogen<sup>™</sup> em TAE 1x (40mM de Tris HCl, 20mM de ácido acético, 1mM de EDTA, pH=8,0).

Foi preparado um *mix* contendo 300ng de DNA plasmidial, 2µL de *loading buffer* (Glicerol (50%), Azul de Bromofenol (0,125%), Xileno Cianol (0,125%), pH=8,0 e água Milli-Q para um volume final de 7µL por poço. No gel foi colocado o plasmídeo digerido, e plasmídeo não digerido em conjunto, como um controle. A corrida foi realizada a 75 volts por 1 hora. O marcador referência utilizado foi o λDNA/Hind III da Ambion<sup>®</sup> [0,5mg/mL]. Os géis foram fotodocumentados no equipamento *ImageQuant*<sup>™</sup> LAS 500 da GE Healthcare Life Sciences.

#### 5.6.4.3 PCR quantitativo em Tempo Real

A reação de *qPCR* para cálculo do título viral foi realizada pelo sistema TaqMan<sup>™</sup> da Applied Biosystems. O *mix* da reação de *qPCR* foi preparado no volume final de 15µL por poço, e cada reação foi feita em triplicata para cada amostra. Para o gene da β-actina (ensaio inventariado) foi preparado um *mix* contendo 7,5µL de TaqMan; 0,75µL de sonda (20x); 1,75µL de água livre de nucleases; 5µL de DNAg extraído das células transduzidas com 2, 5 e 10µL de concentrado lentiviral. Para o gene LTR foi preparado um *mix* contendo 7,5µL de TaqMan; 0,3µL de sonda (100nM); 0,9µL do *primer forward* (30nM); 0,9µL do *primer reverse* (30nM); 0,4µL de água livre de nucleases; 5µL de DNAg das mesmas amostras transduzidas. A ciclagem da *qPCR* iniciou-se com 50°C por 2 minutos seguidos da desnaturação a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de: 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

#### 5.6.4.4 Cálculo do título viral por PCR quantitativo em Tempo Real

A partir das quantificações do DNA genômico obtidas da célula virgem e do DNA plasmidial de interesse, e levando em consideração o tamanho do genoma e o tamanho do DNA plasmidial, previamente digerido e purificado, foram calculados o número de cópias do gene endógeno  $\beta$ -actina (para a célula virgem), e o número de cópias do gene LTR, para as linhagens transduzidas, presente em cópia única na sequência de DNA plasmidial. O cálculo do número de cópias do gene endógeno e do gene alvo é fundamental para gerar as curvas padrão, que servem de base para a quantificação absoluta do gene LTR, e do endógeno. Em seguida, é feita a quantificação relativa, levando em consideração o número de cópias de cada gene, o que nos fornece, ao final, o número de partículas virais por mL do concentrado viral.

O número de cópias para a obtenção das curvas foi feito de acordo com o protocolo “*Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR*” da Applied Biosystems. A curva padrão para o gene da  $\beta$ -actina foi feita a partir do valor inicial de  $3 \times 10^5$  cópias do gene, obtido do DNAg da linhagem 293FT virgem. Já para o gene LTR, a curva foi feita a partir da quantificação e do tamanho do DNA plasmidial, previamente linearizado e purificado, também a partir do valor inicial de  $3 \times 10^5$  cópias do gene (Tabela 3). A partir do valor inicial foram feitas diluições seriadas de 1:10 até o ponto de 30 cópias, totalizando cinco pontos por curva. As análises foram realizadas na máquina *StepOnePlus™ Real-Time PCR System*, e a partir dos valores do “*quantity*” das curvas padrão geradas, foi determinado o número de cópias do gene relativo a  $\beta$ -actina e da sequência LTR para as amostras de células 293FT transduzidas. Em seguida, os valores obtidos foram utilizados para calcular o título viral, a partir do valor médio das transduções realizadas de 2, 5 e 10  $\mu$ L do concentrado viral, de acordo com Matsui e colaboradores (2007), como demonstrado pela fórmula:

**{[(Média do número de cópias LTR\*2/Média do número de cópias  $\beta$ -actina)\*número de células plaqueadas]\*fator de diluição}.**

**Tabela 3.** Diluição seriada (1:10) do DNAg isolado da linhagem celular 293FT/Virgem a partir de  $3 \times 10^5$  cópias do gene da  $\beta$ -actina e do DNA plasmidial digerido e purificado (pLV\_B4B2\_Hef1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_UbC\_Puro e pLV\_B4B2\_Hef1 $\alpha$ \_GBA\_Mut\_UbC\_Puro) a partir de  $3 \times 10^5$  cópias do gene LTR.

<b>Nº de Cópias dos genes – <math>\beta</math>-actina e LTR</b>	<b>Concentração de DNAg isolado da linhagem 293FT/Virgem</b>	<b>Concentração de DNA plasmidial</b>
$3 \times 10^5$	198ng/uL	$8,8 \times 10^{-13}$ pg/uL
$3 \times 10^4$	19,8ng/uL	$8,8 \times 10^{-14}$ pg/uL
$3 \times 10^3$	1,98ng/uL	$8,8 \times 10^{-15}$ pg/uL
300	0,198ng/uL	$8,8 \times 10^{-16}$ pg/uL
30	0,0198ng/uL	$8,8 \times 10^{-17}$ pg/uL

### 5.7 TRANSDUÇÃO LENTIVIRAL

A estratégia para geração das linhagens permanentes, portadoras das sequências de cDNA selvagem e otimizada, consistiu em seis ciclos de transdução com MOI entre 30-60, e o título viral foi calculado a partir da média das transduções com 2, 5 e 10 $\mu$ L do concentrado lentiviral, previamente realizadas. A partir do valor obtido de partículas virais/mL, foi calculado o volume do concentrado viral necessário, levando-se em consideração o número de células plaqueadas ( $2 \times 10^5$  células) anteriormente a cada ciclo de transdução e o MOI desejado. As células foram plaqueadas em placa de 6 poços com 2mL de meio DMEM. Após 8h de cultivo, o meio DMEM foi trocado por meio Opti-MEM para a realização da transdução. O concentrado viral foi gotejado no meio celular de acordo com o calculado previamente, e conjuntamente foi adicionado o polibreno (6 $\mu$ g/mL), visando aumentar a eficiência da transdução. A placa foi centrifugada por 40 minutos, a 22°C e 1200rpm (*spinoculation*), e apenas no dia seguinte o meio foi novamente trocado por DMEM com 10% SBF e 1% antibiótico. Após a recuperação e crescimento das células transduzidas, as mesmas foram tripsinizadas e replaqueadas para a realização do segundo ciclo de transdução e assim sucessivamente. Parte das células transduzidas foram congeladas, a fim de garantir o experimento. O tempo entre uma transdução e outra variou de 2 a 7 dias.

## **5.8 PRODUÇÃO DA GCASE PELAS LINHAGENS L17\_293FT\_GBA\_SYN E L18\_293FT\_GBA\_WT**

### **5.8.1 Tratamento das populações mistas com o antibiótico puromicina**

As linhagens geradas foram tratadas com o antibiótico puromicina (Gibco™ *Sterile Puromycin Dihydrochloride*) por 10 dias a fim de selecionar as células transduzidas, dado que a sequência de inserção apresenta o gene de resistência à puromicina. A dose utilizada foi de 2µg/mL, previamente testada por Gomes (2016) em sua dissertação de mestrado. O teste para determinação da dose foi realizado com a linhagem 293FT virgem, nas concentrações de 0,5µg/mL; 1µg/mL; 2µg/mL e 4µg/mL. A dose de 2µg/mL foi selecionada como sendo de alta estringência, uma vez que todas as células virgens morreram em cerca de 48h após tratamento com 1µg/mL de puromicina.

### **5.8.2 Produção da GCASE pela população mista da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM em meio reduzido de soro – Opti-MEM da Gibco®**

A fim de avaliar a atividade da GCASE em meio Opti-MEM, ideal para utilização durante transduções, foram plaqueadas  $3 \times 10^5$  células da população mista da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM. Trocou-se o meio após 48h de cultivo, e após mais 48h foi realizada a coleta do sobrenadante celular. O sobrenadante foi centrifugado a 1500rpm, a 10°C, por 5 minutos para retirar os *debris* celulares e foi estocado em *freezer* -80°C para posterior análise de atividade biológica. Essa análise foi importante para definirmos o meio de cultivo ideal para as linhagens geradas.

### **5.8.3 Produção da GCASE pela população mista da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM tratada com o antibiótico puromicina nas concentrações de 1µg/mL e 5µg/mL**

Após o tratamento de 10 dias com 2µg/mL de puromicina, a linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM foi tratada por mais 5 dias com 1 e 5µg/mL de puromicina e expandida em garrafa de 75 cm<sup>3</sup>. Para a realização do experimento foram plaqueadas  $3 \times 10^5$  células da população mista, tratadas com as duas diferentes concentrações do antibiótico.

Depois de 48h de cultivo trocou-se o meio, mantendo um experimento em DMEM com 10% SBF e outro experimento em paralelo no qual o meio com 10% SBF foi trocado por DMEM na ausência de SBF. Após mais 48h, foi realizada a coleta do sobrenadante celular. O sobrenadante foi centrifugado a 1500rpm, a 10°C, por 5 minutos para retirar os *debris* celulares, e foi estocado em *freezer* -80°C para posterior análise de atividade biológica.

#### **5.8.4 Produção da GCase pela população mista da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM tratada com o antibiótico puromicina na concentração de 2µg/mL**

Após o tratamento de 10 dias com 2µg/mL de puromicina, a linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM foi expandida em garrafa de 75 cm<sup>3</sup>. Para a realização do experimento foram plaqueadas 3x10<sup>5</sup> células da população mista e trocou-se o meio de cultivo 48h após o plaqueamento, por meio sem SBF. Após mais 48h, foi realizada a coleta do sobrenadante celular. O sobrenadante foi centrifugado a 1500rpm, a 10°C, por 5 minutos para retirar os *debris* celulares, e foi estocado em *freezer* -80°C para posterior análise de atividade biológica.

#### **5.8.5 Escalonamento da produção de GCase no sobrenadante das linhagens L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM e L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM**

Primeiramente as populações mistas das linhagens L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM e L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM foram tratadas com puromicina (2µg/mL) por cinco dias e posteriormente expandidas em garrafas de 75 cm<sup>3</sup>, em meio DMEM com 10% SBF e 1% de antibiótico. A linhagem virgem também foi expandida para servir como controle experimental.

Foram plaqueadas 2x10<sup>7</sup> células em garrafas de 10 andares (1720 cm<sup>2</sup>) (*Falcon Cell Culture Multi-Flask* - BD<sup>®</sup>) e cultivadas por 72h em meio DMEM com 10% SBF e 1% de antibiótico, em um volume final de 560mL. Após as 72h de cultivo, o meio foi trocado por DMEM sem SBF e as linhagens foram mantidas em cultivo por mais 48h. Em seguida, o sobrenadante foi coletado para análise de atividade e o *pellet* foi centrifugado a 4000rpm, por 20 minutos a 4°C, para a realização da contagem do número de células.

#### **5.8.6 Produção de Clones**

Após a seleção das populações mistas com alta estrigência de puromicina (2µg/mL), as populações foram expandidas, e posteriormente 1x10<sup>3</sup> células foram plaqueadas em placa de 100mm para seleção dos clones. Cerca de 1 semana depois foi possível observar em microscópio invertido, as populações clonais separadamente. Essas populações foram demarcadas, tripsinizadas e transferidas para placas de 6 poços. Em seguida, foram expandidas, tratadas por mais cinco dias com puromicina (2µg/mL) e congeladas em alíquotas de 2x10<sup>6</sup> células por criotubo em *freezer* -80°C.

### 5.8.6.1 Seleção dos Clones

Os clones foram selecionados de acordo com os níveis de atividade biológica da GCCase presente no sobrenadante celular. Para isso, foram realizados experimentos em placas de 6 poços, e os clones foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico. Foram plaqueadas  $3 \times 10^5$  células, e após 48 horas (~50% de confluência) foi trocado o meio e esperadas mais 48 horas para coleta do sobrenadante. O sobrenadante foi centrifugado a 1500rpm, a 10°C, por 5 minutos para retirar os *debris* celulares, e foi estocado em *freezer* -80°C para posterior análise de atividade biológica.

### 5.8.7 Produção da GCCase intracelular pela população mista e clones selecionados das linhagens L17\_293FT\_GBA\_SYN e L18\_293FT\_GBA\_WT

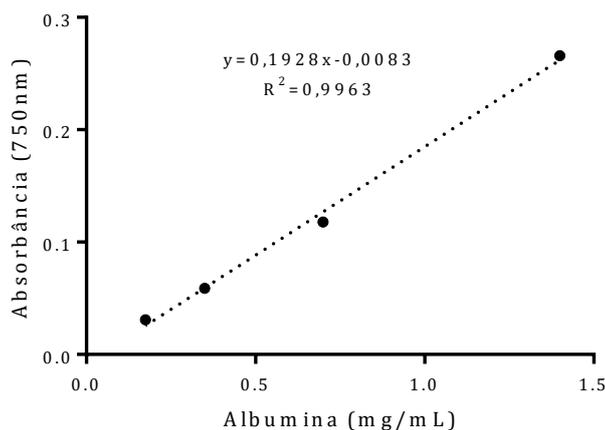
Para avaliar a atividade intracelular da GCCase foram plaqueadas  $2 \times 10^5$  células em placas de 6 poços. Após 48h de cultivo trocou-se o meio por DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico, e após mais 48h foi realizada a coleta do *pellet* de células em 245µL de *Mammalian Protein Extraction Buffer* (GE Healthcare Life Sciences) mais 5µL de coquetel de inibidor de protease, da Sigma-Aldrich. O *pellet* foi homogeneizado e armazenado em *freezer* -80°C para posterior análise.

## 5.9 ATIVIDADE BIOLÓGICA POR ENSAIO FLUORIMÉTRICO

A determinação da atividade da enzima β-glicosilceramidase (GCCase) baseia-se na ação da enzima sob o substrato fluorimétrico 4-metilumbiliferona-β-D-glicopiranosídeo (4MUG) - Sigma-Aldrich, que resulta na liberação da molécula 4-metilumbiliferona (4MU), que em pH alcalino emite uma fluorescência proporcional à quantidade de moléculas que foram hidrolisadas, portanto, atividade biológica. Como controle da reação foram utilizados leucócitos de pessoa que não apresenta a doença (controle positivo da reação). O leucócito foi sonicado (amplitude 60%) para que o *pellet* fosse lisado (3 vezes de 10" cada) ou até formar uma solução homogênea. Antes de realizar a dosagem enzimática dos leucócitos (controle), dosou-se a quantidade de proteína total presente na amostra, pelo método de Lowry, para depois medir a quantidade de GCCase por miligrama de proteína total, ou seja, a atividade específica. A quantificação de proteína total (pelo método de Lowry) foi realizada utilizando o kit comercial DC™ *Protein Assay* (BioRad) de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a leitura da proteína total, os resultados foram analisados para que o valor de absorbância obtido nesta leitura correspondesse a uma quantidade de proteína entre 40-60µg nos 30µL de amostra, que foram utilizados no ensaio de atividade. Foi verificado se a amostra

obteve o valor de absorvância correspondente ao valor de absorvância estabelecido pela curva de calibração. A curva padrão para quantificação da proteína total foi preparada com albumina de soro bovino (BSA), presente no kit DC<sup>TM</sup> *Protein Assay* (BioRad), a partir de 1,4mg/mL de BSA em diluição seriada (1:2) até o ponto de 0,175, com posterior subtração do valor do branco (Figura 6).



**Figura 6.** Curva Padrão de BSA para quantificação de proteína total presente no lisado celular pelo método de Lowry. A equação da reta permite fazer a correlação entre os valores obtidos de absorvância e a quantidade conhecida de BSA em mg/mL.

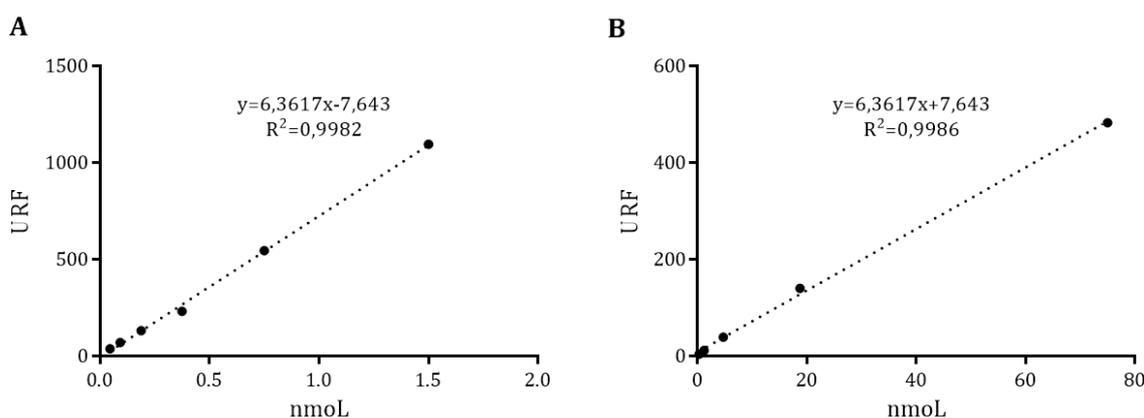
Para a preparação das amostras foram adicionados a cada tubo (âmbar): 20 $\mu$ L de solução trabalho de *Sodium taurodeoxycholate hydrate* (TDC) – Sigma-Aldrich (TDC 2% + tampão citrato fosfato 1M); 50 $\mu$ L de substrato (4MUG); 30 $\mu$ L da amostra. Agitou-se o tubo e após incubou-se por 2h, 100rpm, a 37°C em banho-maria. Após as 2 horas, as amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos. Adicionaram-se 2mL da solução *STOP* (tampão glicina-KOH, pH=10,3) e realizou-se a leitura em fluorímetro *SpectraMax M2* (Molecular Devices) com excitação de 360nm e emissão de 450nm, transferindo 150 $\mu$ L da solução para a cubeta de aspiração. As leituras de fluorescência foram corrigidas pelo valor do “branco”, e os resultados foram comparados com a curva de calibração.

Os valores de atividade enzimática da GCase secretada foram expressos em nanomoles de substrato hidrolisado por mililitro de sobrenadante por hora (nmol/mL/h), enquanto que para a atividade biológica intracelular os resultados foram corrigidos pela quantidade em miligramas de proteína total e expressos em nmol/mg/h. Para gerar a curva padrão para análise da atividade, foi utilizado o reagente 4-metilumbiliferona (4MU) - Sigma-Aldrich, em diluições seriadas a partir de uma concentração inicial conhecida. A curva padrão para análise de atividade biológica da GCase no sobrenadante celular foi preparada com as concentrações de 1,5; 0,75;

0,375; 0,175; 0,093; 0,046 de 4MU em nmol, além do branco, que foi descontado posteriormente.

Para a análise da atividade biológica intracelular, a curva foi realizada a partir de 75nmol de 4MU até o ponto de 0,29, em uma diluição seriada de 1:4. Essa adaptação foi necessária para que os valores obtidos pelas amostras ficassem dentro da curva padrão. A seguir são apresentadas uma curva padrão gerada para as análises de atividade biológica das amostras de sobrenadante e a curva padrão utilizada para o cálculo de atividade das amostras intracelulares (Figura 7). Todas as curvas padrão geradas para as análises realizadas neste trabalho obtiveram valores de  $R^2$  acima de 0,99.

Para análise dos dados ficou definido que uma unidade de atividade biológica da enzima lisossomal *GBA* é a quantidade de enzima necessária para liberar 1 nmol de 4 MU por hora. Para as amostras de sobrenadante a unidade é mililitro de meio de cultura, e para a intracelular a unidade é miligrama de proteína total. Para o controle positivo das reações de atividade foram utilizados leucócitos de pessoa saudável e procedeu-se a análise da mesma forma que o descrito para as amostras intracelulares. A técnica foi realizada em parceria com o laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (UNIFESP), sob responsabilidade da profa. Dra. Vânia D’Almeida. Valores entre 8-35 nmol/h/mg são considerados como atividade padrão para *GBA* em amostras de leucócitos, segundo Goldim e colaboradores (2012).



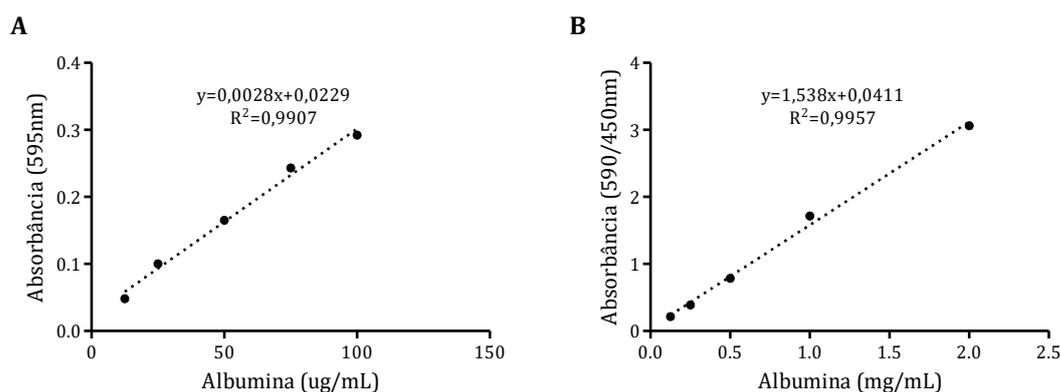
**Figura 7.** Curva Padrão com 4MU para análise de atividade biológica. (A) Curva padrão para análise de amostras de sobrenadante; (B) Curva padrão para análise de amostras de intracelular. URF: Unidades Relativas de Fluorescência.

## 5.10 ESPECTROMETRIA DE MASSA

Para o experimento de espectrometria de massa das linhagens permanentes foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células em placas de 100mm. As células foram cultivadas em 10mL de meio DMEM suplementado com 10% SBF e 1% de antibiótico. Após 24h de cultivo o meio foi trocado por um volume final de 4mL de DMEM com 1% de antibiótico sem SBF, e coletado 48 horas após a troca. O sobrenadante foi centrifugado a 1500rpm, a 10°C, por 5 minutos para retirar os *debris* celulares, e foi estocado em *freezer* -80°C. O *pellet* de células foi ressuspenso em 250µL (235µL de tampão Ureia 8M + Tris 0,1M; 12,5µL do coquetel inibidor de protease, da Sigma-Aldrich; 2,5µL de inibidor de fosfatase (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Ortovanadato de Sódio – 1mM)), homogeneizado e armazenado em *freezer* -80°C. Para proceder com o experimento, primeiramente as amostras de intracelular foram sonicadas por 3 vezes de 10", com amplitude 60%, ou até formar uma solução homogênea. Em seguida, foi realizada a quantificação de proteína total das amostras de sobrenadante e do lisado celular a fim de separar 100µg de proteína total para realização da técnica de espectrometria de massa. A quantificação de proteína total foi realizada pelo método de Bradford, com o kit *Quick Start™ Bradford Protein Assay* (BioRad), e as curvas padrão foram realizadas com BSA de acordo com o apresentado na Figura 8.

Para o experimento de espectrometria de massa do sobrenadante das linhagens com produção transiente da GCase, foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células por placa de 100mm e as transfecções foram realizadas quando a cultura celular atingiu uma confluência entre 50-70%. As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de estreptomicina/penicilina a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A transfecção foi realizada utilizando o reagente *Attractene transfection reagent* (Qiagen inc, CA, USA), segundo especificações do fabricante. O meio de cultura foi trocado 6 horas após a transfecção, por meio DMEM sem SBF, apenas com antibiótico (1%). Para retirar todo o excesso de meio contendo SBF, os poços foram previamente lavados com PBS 1x. Após 48 horas da transfecção, o sobrenadante foi coletado.

Para cada mL de sobrenadante foram adicionados 5µL de *mix* inibidor de protease, e posteriormente o sobrenadante foi centrifugado para remoção dos *debris* celulares, a 10000g por 10 minutos a 4°C. A quantificação da proteína total também foi realizada pelo método de Bradford.

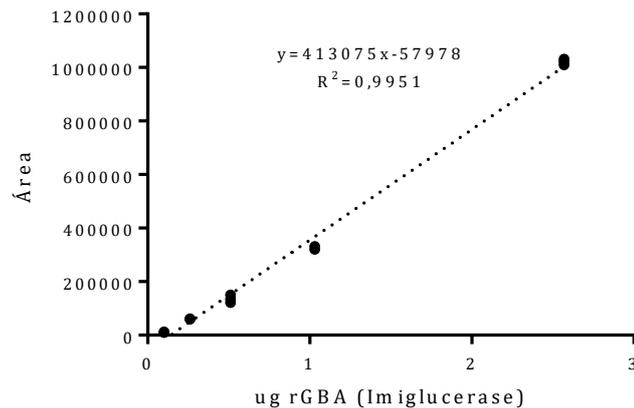


**Figura 8.** Curva padrão de BSA para quantificação de proteína total das linhagens geradas com produção permanente da *GBA*, pelo método de Bradford. A equação da reta permite fazer a correlação entre os valores obtidos de absorbância pela quantidade conhecida de BSA. (A) Curva referente à quantificação de proteína total presente no sobrenadante; (B) Curva referente à quantificação de proteína total presente no lisado celular.

Após a quantificação, foi separado um volume de amostra correspondente aos 100 $\mu$ g de proteína total e, no caso das amostras do sobrenadante celular, para que esse volume não ultrapassasse os 100 $\mu$ L iniciais utilizados na técnica, as mesmas foram secas em *SpeedVac® Plus SC 110A*, da Savant. Em seguida, o volume de todas as amostras foi completado com tampão de desnaturação TrisUreia (pH=8,5) para o volume final de 100 $\mu$ L. Depois foram adicionados 900 $\mu$ L de acetona gelada, e as amostras foram incubadas por 30 minutos no *freezer* (-20°C) e ressuspendidas, com o auxílio do vórtex, a cada 10 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas (12000g por 30 minutos a 4°C). Então o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 100 $\mu$ L de tampão de desnaturação TrisUreia (pH 8,5; Ureia 8M; Tris 0,1M). Em seguida, adicionaram-se 100 $\mu$ g de solução de redução (DTT – *Dithiothreitol*, 100mM) da Sigma-Aldrich, previamente diluída em tampão Ureia 8M + Tris 0,1M, a fim de diminuir os resíduos de cisteína nas proteínas e, as amostras foram mantidas a 37°C sob agitação constante, por 30 minutos. Logo depois, foram adicionados 300 $\mu$ g de solução de alquilação (*Iodoacetamide* 0,5M Sigma-Aldrich), previamente diluída em tampão Tris 0,2M, pH=8,0.

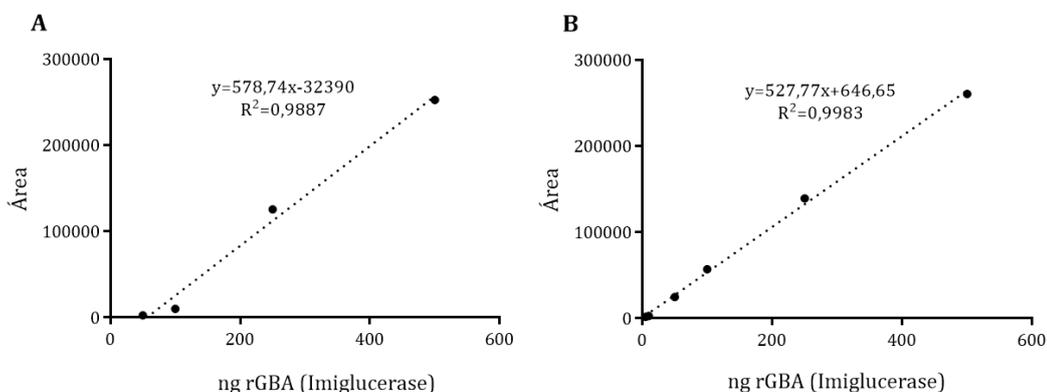
Em seguida adicionou-se o tampão Tris HCl em volume igual ao que foi adicionado das amostras. Depois foram adicionados 4 $\mu$ g de solução de tripsina (*Trypsin from porcine pancreas*, da Sigma-Aldrich) a cada um dos tubos de digestão, que foram incubados por 16h a 37°C, mantidos em agitação constante. Após a digestão, as amostras foram passadas na coluna Oasis® HLB 1cc 10mg, da Waters, previamente condicionadas com solução A (5% de ACN; 0,1% de Ácido Fórmico) e solução B (100% de ACN; 0,1% de Ácido Fórmico). Na sequência, a coluna foi lavada com a solução A, e em seguida, a amostra foi eluída em uma mistura de solução A e B (1:1). O eluído foi colocado em microtubo *Protein LoBind* e secado no *SpeedVac*.

As amostras foram estocadas em *freezer*  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise das amostras. Uma hora antes da análise, as amostras foram ressuspensas em  $50\mu\text{L}$  de solução A, centrifugadas a  $20000g$  por  $30\text{min}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  e transferiu-se  $45\mu\text{L}$  para o *vial* de injeção, para análise. A curva padrão para obtenção dos resultados foi preparada a partir da enzima comercial Imiglucrase (Cerezyme<sup>®</sup>, da Genzyme) (Figura 9) para as análises da produção transiente da GCCase.



**Figura 9.** Curva padrão de rGBA (Imiglucrase) para quantificação da *GBA* presente no sobrenadante das linhagens com produção transiente de GCCase.

Para a quantificação da *GBA* presente no sobrenadante e no lisado celular das linhagens L17 e L18, da população mista e dos melhores clones, previamente selecionados pela análise de atividade biológica, bem como da linhagem virgem, foram realizadas análises de espectrometria de massa, e a quantificação foi realizada a partir de dois peptídeos, P1 – SYFSEEGIGYNIIR e P2 – VVLTDPPEAAK. Para cada peptídeo foi gerada uma curva padrão (Figura 10). Em seguida foi feita a média dos valores obtidos pela análise dos dois peptídeos e obtida a quantificação total de *GBA* presente tanto no sobrenadante como no lisado celular.



**Figura 10.** Curva padrão de rGBA (Imiglucrase) para quantificação da *GBA* presente no sobrenadante e no lisado celular das linhagens com produção permanente de GCCase. (A) Curva referente ao peptídeo SYFSEEGIGYNIIR; (B) Curva referente ao peptídeo VVLTDPPEAAK.

## 5.11 NÚMERO DE CÓPIAS INTEGRADAS DA SEQUÊNCIA DO cDNA DA *GBA* SELVAGEM E OTIMIZADA PELA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

### 5.11.1 Cálculo do Número de Cópias Integradas

Para o cálculo do número de cópias foram plaqueadas  $2 \times 10^5$  células das populações mistas das linhagens geradas bem como dos dois clones mais produtivos de cada uma delas. O experimento foi feito em placa de 6 poços com meio DMEM suplementado com 10% SBF e 1% antibiótico. Após 24 horas de cultivo o meio foi trocado por meio fresco, e depois de 48h foi extraído o DNA genômico com o *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, e eluído em um volume final de 100 $\mu$ L. Em paralelo também foi cultivada a linhagem 293FT virgem para construção da curva padrão para o gene da albumina.

### 5.11.2 Padronização dos *Primers*

Os *primers* foram previamente otimizados e testados a fim de saber qual a concentração ideal, garantindo que a eficiência dos mesmos se mantenha entre 90-110%. A curva da albumina foi feita com a amostra de DNAg de virgem, e a curva referente ao gene-alvo WPRE (*posttranscriptional regulatory element of woodchuck hepatitis vírus*) foi feita com o DNA plasmidial referente à sequência cuja a integração se quer verificar. A reação de *qPCR* para cálculo do número de cópias foi realizada com o reagente *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* da Applied Biosystems, desta forma, fez-se necessário o teste da concentração ideal dos *primers*. As sequências dos pares de *primers* são apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Par de *primers* para o gene da Albumina e do WPRE, utilizados para cálculo do número de cópias integradas do gene da *GBA*.

Gene-alvo	Primer Sense (1) Anti-sense (2)
Albumina	(1) 5' TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT 3' (2) 5' CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT 3'
WPRE	(1) 5' CCGTTGTCAGGCAACGTG 3' (2) 5' AGCTGACAGGTGGTGGCAAT 3'

Os resultados foram conforme o esperado, e os valores de eficiência obtidos ficaram entre o aceitável (90-110%); porém como a própria placa do número de cópias apresenta os valores de eficiência de acordo com a quantificação absoluta obtida pelas curvas padrão do

endógeno (Albumina) e do gene-alvo WPRE, foram apresentados aqui os valores de eficiência obtidos na placa do número de cópias (Tabela 5).

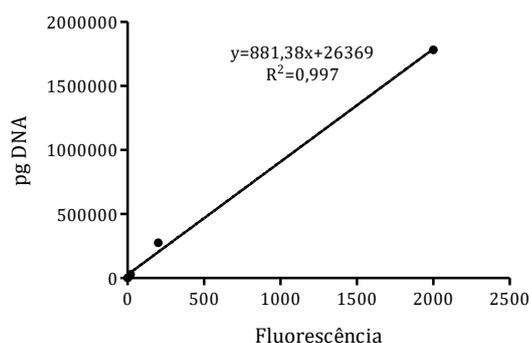
**Tabela 5.** Eficiência dos *primers* utilizados na *qPCR* do cálculo do número de cópias referente às sequências de cDNA da *GBA* selvagem e otimizada.

Gene-alvo	Slope	Y-Inter	R <sup>2</sup>	Eficiência
Albumina	-3,331	37,115	0,989	99,623
WPRE	-3,26	38,505	0,987	102,642

### 5.11.3 PCR quantitativo em Tempo Real

A reação de *qPCR* para cálculo do número de cópias foi realizada pelo sistema *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* da Applied Biosystems. O *mix* da reação de *qPCR* foi preparado no volume final de 15µL por poço, e cada reação foi feita em triplicata para cada amostra. O *mix* foi preparado contendo 7,5µL de SYBR; 1µL do *primer forward*; 1µL do *primer reverse*; 0,5µL de água livre de nucleases; 5µL de DNAg extraído das populações mistas e clones das linhagens permanentes.

Para o gene da albumina a concentração do par de *primers* na reação foi de 0,166µM e para o par de *primers* do gene WPRE a concentração final foi de 0,08µM. A ciclagem da *qPCR* iniciou-se com 50°C por 2 minutos seguidos por 10 minutos a 95°C, e 40 ciclos: 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As curvas para o cálculo do número de cópias bem como a obtenção e digestão do DNA plasmidial utilizado na curva padrão do WPRE foram realizadas da mesma forma que para o cálculo do título viral. Para cada reação foram utilizados 20ng de DNA genômico (4ng/µL) e visando a alta fidelidade dos dados obtidos, as amostras foram quantificadas pelo método de fluorescência com o kit *QuantiFluor® dsDNA System* da Promega. A quantificação das amostras (Tabela 6) e a curva padrão relativa à quantificação são apresentadas na Figura 11.



**Figura 11.** Curva padrão realizada com o DNA padrão do kit *QuantiFluor® dsDNA System*, para quantificação por fluorescência das amostras para cálculo do número de cópias.

**Tabela 6.** Quantificação das amostras por fluorescência, para cálculo do número de cópias.

<b>Amostra</b>	<b>ng/<math>\mu</math>L</b>
<b>DNA plasmidial digerido</b>	26,24
<b>293FT/Virgem</b>	427,62
<b>L18_293FT_GBA_WT_PM</b>	93,14
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.4</b>	34,28
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.9</b>	242,24
<b>L17_293FT_GBA_SYN_PM</b>	88,3
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.15</b>	246,47
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.16</b>	133,82

## 5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste  $t$  não paramétrico com correção de Welch's, com valor de  $p$  fixado em 0,05. Para comparações entre três linhagens ou mais foi utilizado o teste de ANOVA. Os gráficos foram gerados pelo *software GraphPad Prism versão 7.00 (GraphPad Software, San Diego California USA)*.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 PRODUÇÃO TRANSIENTE DA GCase RECOMBINANTE HUMANA

#### 6.1.1 Atividade da GCase no sobrenadante celular das populações transientes

As linhagens transientes mostraram níveis promissores de atividade biológica de GCase e esta, se mostrou biologicamente ativa no sobrenadante celular. A linhagem transfectada com o vetor vazio obteve níveis de atividade enzimática da GCase secretada da ordem de 4,69 ( $\pm$  1,96) U/mL, enquanto que a linhagem transfectada com o plasmídeo portador do cDNA da *GBA* selvagem apresentou atividade da GCase da ordem de 6,62 ( $\pm$  2,11) U/mL e 2,77 ( $\pm$  0,17) U/mL sob o controle dos promotores CMV e HeF1 $\alpha$ , respectivamente.

Para a linhagem transfectada com o plasmídeo portador do cDNA da *GBA* otimizada, os níveis de produção enzimática de GCase no meio extracelular foi da ordem de 25,61 ( $\pm$  5,4) U/mL e 133,2 ( $\pm$  26,17) U/mL sob o controle dos promotores CMV e HeF1 $\alpha$ , respectivamente. Os níveis de GCase produzido no sobrenadante da linhagem transfectada com os plasmídeos portadores do cDNA da *GBA* otimizada sob o controle dos promotores CMV e HeF1 $\alpha$  foi 3,87 ( $p = 0,057$ ) e 48,13 vezes ( $p = 0,038$ ) mais elevado em comparação com a linhagem transfectada com os plasmídeos portadores do cDNA da *GBA* selvagem sob o controle dos mesmos promotores, tendo sido estatisticamente diferente entre as linhagens 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT e 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN.

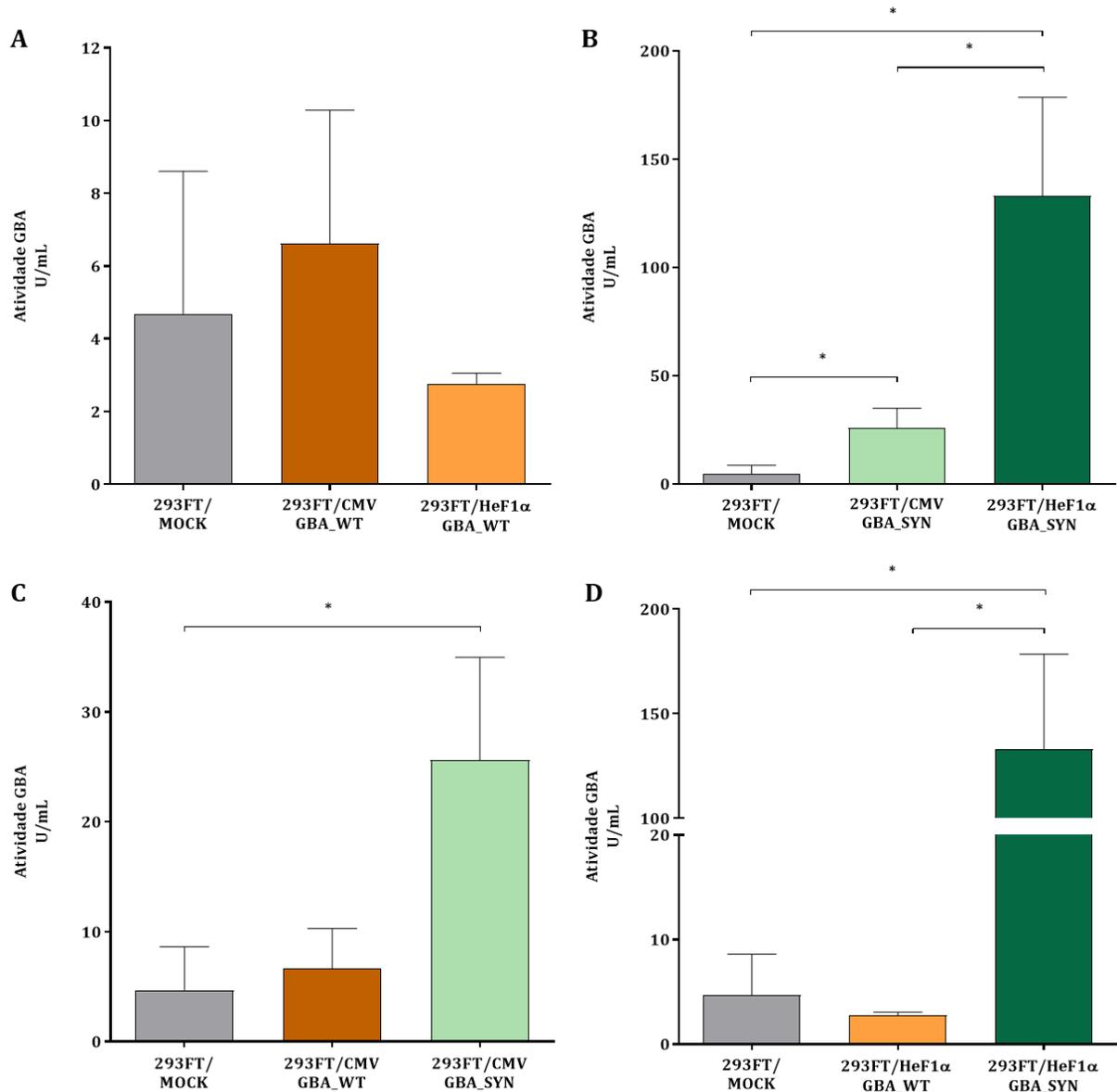
Em comparação com a linhagem transfectada com o vetor vazio MOCK, os níveis de produção da GCase no sobrenadante da linhagem 293FT/CMV\_GBA\_SYN foi 5,47 vezes maior ( $p = 0,047$ ) e 28,4 vezes maior do que o encontrado para a linhagem 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN ( $p = 0,038$ ), sendo que ambas as comparações foram estatisticamente significantes. Em comparação com a linhagem transfectada com os plasmídeos portadores do cDNA da *GBA* selvagem, a linhagem 293FT/CMV\_GBA\_WT apresentou níveis de atividade de GCase no sobrenadante celular cerca de 1,4 vezes maior em relação a linhagem transfectada com o vetor vazio ( $p = 0,53$ ) e em relação a linhagem 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT, a linhagem transfectada com MOCK obteve atividade cerca de 1,7 vezes mais elevada ( $p = 0,40$ ), o que não foi estatisticamente significativo.

Na Tabela 7 encontram-se os valores de atividade biológica apresentados pelas diferentes linhagens. A Figura 12 apresenta os gráficos com os diferentes níveis de produção de GCase pelas linhagens geradas. A comparação dos níveis de atividade no sobrenadante celular entre todas as linhagens, pelo teste ANOVA e pós teste de Tukey mostrou que a

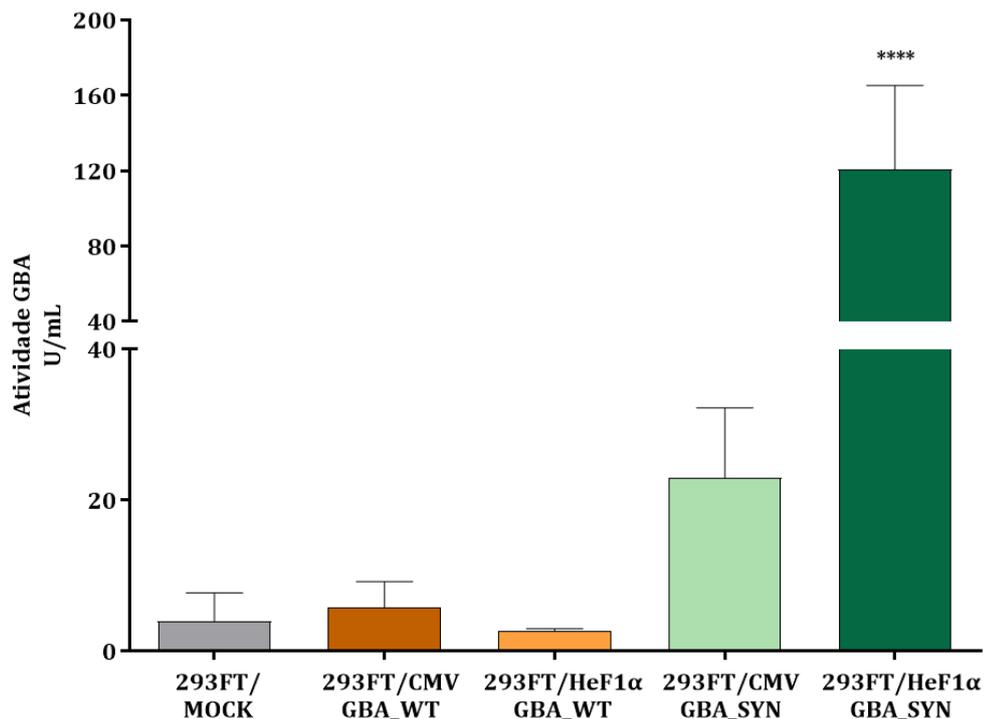
linhagem 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN difere de todas as outras, com valor de  $p < 0,0001$  (Figura 13).

**Tabela 7.** Dados de atividade biológica da GCase no sobrenadante das linhagens com produção transiente.

<b>Amostra</b>	<b>Atividade Biológica (U/mL)</b>	<b>Média Atividade Biológica (U/mL)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>CV%</b>
293FT/MOCK (1)	1,20	4,69	3,92	83,69
293FT/MOCK (2)	1,60			
293FT/MOCK (3)	6,77			
293FT/MOCK (4)	9,17			
293FT/CMV_GBA_WT (1)	3,27	6,62	3,66	55,28
293FT/CMV_GBA_WT (2)	6,07			
293FT/CMV_GBA_WT (3)	10,53			
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_WT (1)	2,60	2,77	0,29	10,43
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_WT (2)	2,60			
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_WT (3)	3,10			
293FT/CMV_GBA_SYN (1)	14,87	25,61	9,35	36,51
293FT/CMV_GBA_SYN (2)	30,03			
293FT/CMV_GBA_SYN (3)	31,93			
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_SYN (1)	83,63	133,19	45,32	34,03
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_SYN (2)	143,40			
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_SYN (3)	172,53			



**Figura 12.** Atividade biológica transitória da GCase no sobrenadante celular. (A) A linhagem 293FT/CMV\_GBA\_WT apresentou atividade enzimática da GCase 1,4 e 2,4 vezes maior em relação a MOCK e 293FT/HeF1α\_GBA\_WT, respectivamente; (B) A linhagem 293FT/HeF1α\_GBA\_SYN apresentou atividade da GCase 28,4 vezes maior em relação a MOCK e 5,2 vezes maior em relação a 293FT/CMV\_GBA\_SYN; (C) Entre as linhagens sob o controle do promotor CMV, a linhagem 293FT/CMV\_GBA\_SYN apresentou níveis de atividade 3,87 vezes mais elevados em relação a 293FT/CMV\_GBA\_WT; (D) A linhagem 293FT/HeF1α\_GBA\_SYN apresentou atividade 48 vezes mais elevada em relação a 293FT/HeF1α\_GBA\_WT.



**Figura 13.** Comparação entre os níveis de atividade biológica transiente da GCase no sobrenadante celular das linhagens pelo teste de ANOVA e pós teste de Tukey (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

A sequência otimizada apresentou resultados iniciais promissores em relação a sequência selvagem, e a mesma sequência sob o controle do promotor HeF1 $\alpha$  obteve níveis de atividade da GCase 5,2 vezes mais elevado em relação à sequência sob o controle do promotor CMV. Levando em consideração esses resultados iniciais e sabendo da importância de comparar as sequências, selvagem e otimizada, sob o controle do mesmo promotor, optamos por dar continuidade das análises apenas sob o controle do promotor HeF1 $\alpha$ .

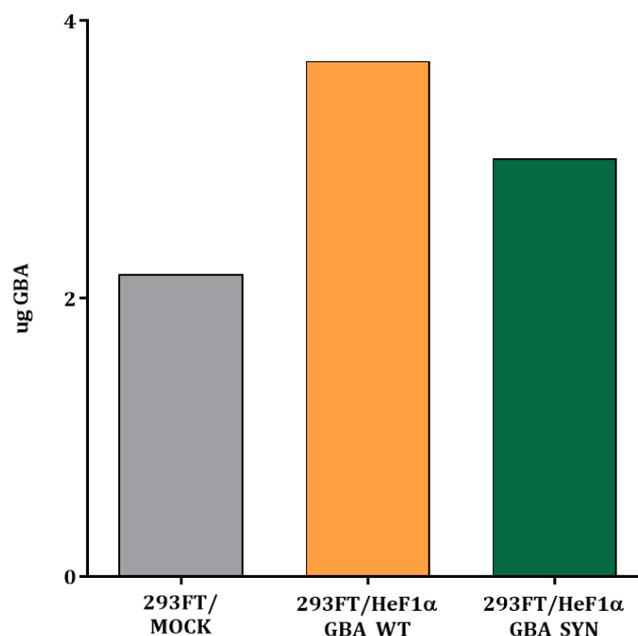
### 6.1.2 Quantificação da GCase por espectrometria de massa produzida pelas populações transientes

A quantificação da *GBA* secretada pela linhagem 293FT transfectada foi realizada com os vetores LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_P<sup>+</sup>, LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup> e com o vetor vazio MOCK por espectrometria de massa. A análise para quantificação da *GBA* foi a partir de 100 $\mu$ g de proteína total presente nos 4mL de sobrenadante sem soro bovino fetal, coletado 48h após transfecção transiente realizada em placas de 100mm (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valores médios obtidos de área e seu valor correspondente em  $\mu\text{g}$  de proteína para cada peptídeo analisado (cinco no total), o que na média resulta na quantidade de *GBA* em  $\mu\text{g}$  presente no sobrenadante da cultura celular.

Amostra	Peptídeo: VVLTDP EAAK		
	Área	9%	100%
293FT/MOCK	9821	0,164	1,824
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_WT	33362	0,221	2,457
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_SYN	25482	0,202	2,245
Amostra	Peptídeo: FIPEGSQR região C-terminal		
	Área	9%	100%
293FT/MOCK	59457	0,284	3,159
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_WT	120671	0,433	4,808
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_SYN	175332	0,565	6,276
Amostra	Peptídeo: VGLVASQK região C-terminal		
	Área	9%	100%
293FT/MOCK	12241	0,17	1,889
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_WT	23608	0,198	2,195
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_SYN	39621	0,236	2,625
Amostra	Peptídeo: FLDAYAEHK região N-terminal		
	Área	9%	100%
293FT/MOCK	3703	0,149	1,659
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_WT	32741	0,22	2,44
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_SYN	1896	0,145	1,611
Amostra	Peptídeo: SYFSEEGIGYNIIR região N-terminal		
	Área	9%	100%
293FT/MOCK	29265	0,211	2,347
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_WT	189104	0,598	6,646
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_SYN	26700	0,205	2,278
Amostra	Média dos Cinco Peptídeos		
	Área	9%	100%
293FT/MOCK	22897,4	0,196	2,176
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_WT	79897,2	0,334	3,709
293FT/HeF1 $\alpha$ _GBA_SYN	53806,2	0,271	3,007

Como resultado final, após fazer a média entre os cinco peptídeos analisados, da quantificação da *GBA* secretada pelas linhagens, a linhagem transfectada com o vetor MOCK obteve uma produção de 2,18 $\mu\text{g}$  de *GBA* no sobrenadante, a linhagem transfectada com LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT<sup>+</sup> obteve uma produção de 3,7 $\mu\text{g}$  e para a linhagem transfectada com LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN<sup>+</sup> foi obtida uma produção de 3 $\mu\text{g}$  de *GBA* no sobrenadante (Figura 14). Os valores obtidos não apresentaram diferença significativa entre as amostras analisadas.



**Figura 14.** Concentração em  $\mu\text{g}$  de *GBA* a partir de  $100\mu\text{g}$  de proteína total, presente em 4mL de sobrenadante da linhagem 293FT transfectada com os vetores plasmidiais MOCK, LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_P<sup>+</sup> e LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup>.

## 6.2 PRODUÇÃO DAS LINHAGENS PERMANENTES TRANSDUZIDAS COM AS PARTÍCULAS LENTIVIRAIS

Visando a obtenção de partículas virais, a cultura de células 293FT foi transfectada com os plasmídeos pCMV $\Delta$ R8.91 e pCMV-VSV-G, responsáveis por formar as partículas lentivirais e com o plasmídeo portador da sequência de interesse. Após a coleta do sobrenadante, foi realizada a concentração do mesmo.

### 6.2.1 Identificação da formação de partículas lentivirais por teste imunoenzimático

Para verificar se havia formado as partículas lentivirais, o sobrenadante foi submetido ao teste de imunorreatividade de ELISA para confirmação da presença do lentivírus, no sobrenadante celular, pela detecção do antígeno da cápsula viral P24. Em conjunto com a amostra de sobrenadante também foi realizado o teste apenas com meio de cultura (branco) a fim de obtermos um controle negativo da reação imunoenzimática, como pode ser visto na Tabela 9.

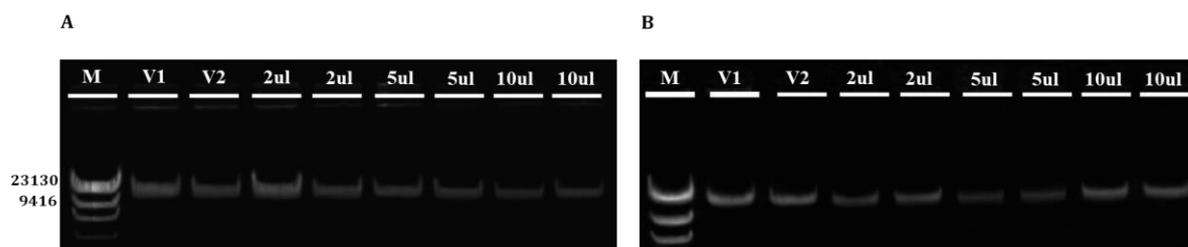
**Tabela 9.** Imunoensaio enzimático - Confirmação da presença do lentivírus no sobrenadante celular por ELISA, pela detecção da presença do antígeno da cápsula viral P24.

AMOSTRA	ENSAIO	RESULTADO
<b>Branco</b>	HIV Ag/Ab	0.11 S/CO Não Reativo
	HIV Ag/Ab	0.14 S/CO Não Reativo
<b>LV_HeF1<math>\alpha</math>_GBA_WT_P<sup>+</sup></b>	HIV Ag/Ab	2189.87 S/CO Reativo
	HIV Ag/Ab	2192.74 S/CO Reativo
<b>Branco</b>	HIV Ag/Ab	0.23 S/CO Não Reativo
	HIV Ag/Ab	0.32 S/CO Não Reativo
<b>LV_HeF1<math>\alpha</math>_GBA_SYN_P<sup>+</sup></b>	HIV Ag/Ab	1904.73 S/CO Reativo
	HIV Ag/Ab	1881.82 S/CO Reativo
	HIV Ag/Ab	1.897.78 S/CO Reativo
	HIV Ag/Ab	1892.97 S/CO Reativo

De acordo com a tabela podemos observar que o teste de ELISA foi reativo para o sobrenadante, mostrando haver a formação de partículas lentivirais, enquanto que o controle negativo não apresentou imunomarcagem para a proteína P24.

### 6.2.2 Cálculo do título viral dos vetores LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_P<sup>+</sup> e LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup>

A partir da confirmação da formação de partículas lentivirais, foi realizada a transdução com os diferentes volumes de concentrado viral (2, 5 e 10 $\mu$ L) e obtido o valor do título viral por meio de *qPCR* em tempo real. Os resultados obtidos para o título viral após a concentração foram de 5,24x10<sup>8</sup> e 7,88x10<sup>8</sup> partículas virais por mililitro (PV/mL), referentes aos plasmídeos LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_P<sup>+</sup> e LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup>, respectivamente. Foram realizados seis ciclos de transdução lentiviral para cada construção lentiviral com MOI entre 30-60. Após as transduções, as linhagens geradas foram expandidas e tratadas com alta estrigência de puromicina (2 $\mu$ g/mL). Na Figura 15 podemos observar o DNA genômico extraído da linhagem 293FT/Virgem e das linhagens transduzidas com 2, 5 e 10 $\mu$ L do concentrado viral para ambas as construções lentivirais, em duplicata.



**Figura 15.** DNA genômico isolado das linhagens 293FT/Virgem e 293FT transduzida com 2, 5 e 10uL do concentrado viral. (A) M - Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III; (V1 e V2) DNAG da linhagem 293FT/Virgem; DNAG das linhagens transduzidas com as diferentes quantidades do concentrado lentiviral referente ao plasmídeo LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_P<sup>+</sup>; (B) M - Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III; (V1 e V2) DNAG da linhagem 293FT/Virgem; DNAG das linhagens transduzidas com as diferentes quantidades do concentrado lentiviral referente ao plasmídeo LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup>.

### 6.3 PRODUÇÃO DA GCase PELAS LINHAGENS PERMANENTES

#### L17\_293FT\_GBA\_SYN e L18\_293FT\_GBA\_WT

##### 6.3.1 Produção da GCase pela população mista da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM em meio reduzido de soro – Opti-MEM da Gibco®

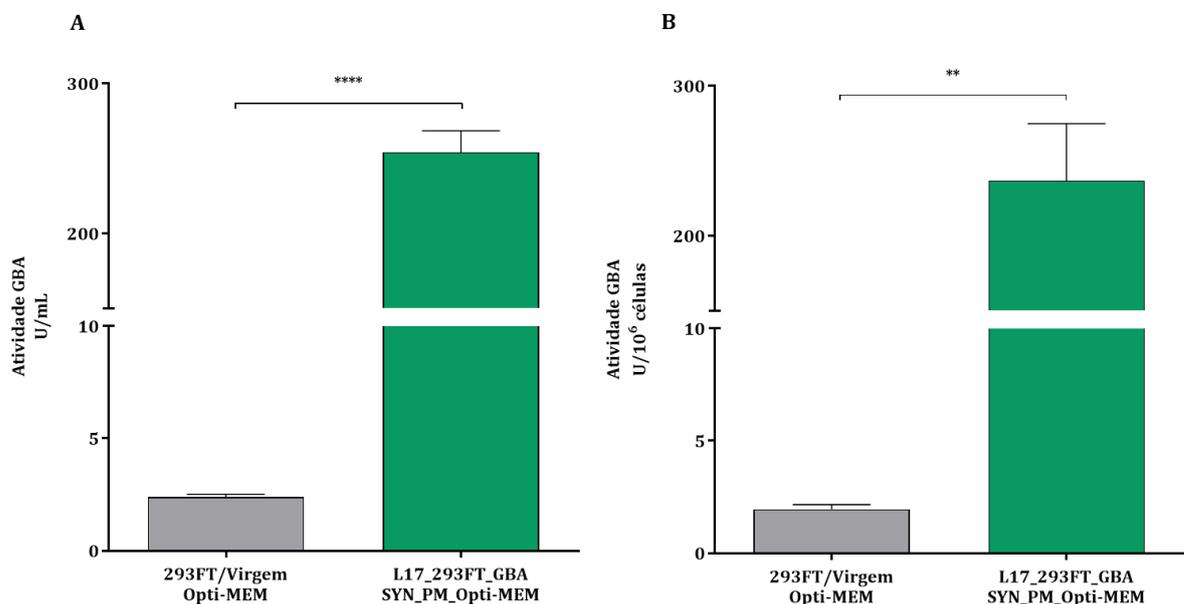
A linhagem foi cultivada em meio Opti-MEM e trocou-se o meio após 48h de cultivo e após mais 48h foi realizada a coleta do sobrenadante celular para análise de atividade biológica. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 10.

**Tabela 10.** Dados de atividade biológica da GCase no sobrenadante da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM após 48h de cultivo em meio reduzido de soro, e a atividade da mesma por milhão de células.

Amostra	Nº de células após 96h	Atividade Biológica (U/mL)	Atividade (U/10 <sup>6</sup> células)	Desvio Padrão	CV%
Leucócitos*	----	15,113	----	2,09	12,58
	----	18,063	----		
293FT/Virgem (1)	2,2x10 <sup>6</sup>	2,294	2,085	0,13	5,61
293FT/Virgem (2)	2,7x10 <sup>6</sup>	2,253	1,669		
293FT/Virgem (3)	2,3x10 <sup>6</sup>	2,544	2,121		
293FT/Virgem (4)	2,5x10 <sup>6</sup>	2,436	1,949		
L17_293FT_GBA_SYN_PM (1)	1,6x10 <sup>6</sup>	233,098	291,373	14,41	5,67
L17_293FT_GBA_SYN_PM (2)	2,4x10 <sup>6</sup>	264,301	229,251		
L17_293FT_GBA_SYN_PM (3)	2,3x10 <sup>6</sup>	256,572	223,106		
L17_293FT_GBA_SYN_PM (4)	2,6x10 <sup>6</sup>	262,582	202,861		

\*U/mg

Os resultados obtidos mostraram que a linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM apresentou níveis de atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular de 254,1 ( $\pm$  7,21) U/mL e quando corrigido pelo número de células a atividade foi de 236,6 ( $\pm$  19,09) U/10<sup>6</sup> células. Em comparação com a linhagem 293FT/Virgem sob as mesmas condições de cultivo, a linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM obteve uma produção enzimática cerca de 107 vezes mais elevada por mL de sobrenadante (2,38 ( $\pm$  0,07) U/mL) ( $p$  < 0,0001) e 121 vezes mais elevada quando corrigido por milhão de células (1,96 ( $\pm$  0,103) U/10<sup>6</sup> células) ( $p$  = 0,001), (Figura 16).



**Figura 16.** Atividade biológica da GCCase. Níveis de atividade biológica da GCCase no sobrenadante da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM em comparação com a 293FT/Virgem cultivadas em meio reduzido de soro. (A) A linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM obteve uma produção em nmol/ml/h 107 vezes mais elevada em relação a virgem; (B) O valor de atividade de GCCase quando corrigido por milhão de células foi 121 vezes mais elevado na L17 em relação a virgem.

### 6.3.2 Produção da GCCase pela população mista da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM tratada com diferentes concentrações do antibiótico puromicina

Após o término dos seis ciclos de transdução viral a dose selecionada para a obtenção da população celular humana transgêncica foi de 2 $\mu$ g/mL de puromicina, pois essa é a dose do IC<sub>90</sub> para a linhagem celular 293FT virgem (dados não mostrados). Porém, para investigar a relação dose do antibiótico puromicina *versus* nível de produção da enzima lisossomal recombinante, a linhagem celular L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM foi tratada com uma dose inferior e outra dose superior a mesma. Após 5 dias de tratamento com puromicina nas concentrações de baixa (1 $\mu$ g/mL) e alta estringência (5 $\mu$ g/mL), foi realizada a análise de

atividade biológica no sobrenadante celular da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM após 48h em meio DMEM suplementado com 10% SBF e na ausência de SBF. A Tabela 11 a seguir mostra os resultados obtidos.

**Tabela 11.** Dados de atividade biológica da GCase no sobrenadante da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM tratada com baixa e alta estringência do antibiótico puromicina (1 e 5µg/mL), após 48h de cultivo em DMEM suplementado com 10% SBF e na ausência de SBF.

Amostra	Número de células após 96h	Média número de células após 96h	Atividade Biológica Sobrenadante (U/mL)	Média Atividade Biológica Sobrenadante (U/mL)	Desvio Padrão	CV%
293FT/Virgem_SBF <sup>+</sup> (1)	3,4x10 <sup>6</sup>	3,18x10 <sup>6</sup>	7,64	7,04	0,40	5,69
293FT/Virgem_SBF <sup>+</sup> (2)	3,2x10 <sup>6</sup>		6,80			
293FT/Virgem_SBF <sup>+</sup> (3)	2,9x10 <sup>6</sup>		6,84			
293FT/Virgem_SBF <sup>+</sup> (4)	3,2x10 <sup>6</sup>		6,87			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>+</sup> (1) 1µg/mL-P*	2,8x10 <sup>6</sup>	3,1x10 <sup>6</sup>	374,28	329,71	31,02	9,41
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>+</sup> (2) 1µg/mL-P	3,3x10 <sup>6</sup>		317,83			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>+</sup> (3) 1µg/mL-P	3,4x10 <sup>6</sup>		302,79			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>+</sup> (4) 1µg/mL-P	2,9x10 <sup>6</sup>		323,93			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>+</sup> (1) 5µg/mL-P	2,9x10 <sup>6</sup>	2,68x10 <sup>6</sup>	468,16	439,49	24,05	5,47
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>+</sup> (2) 5µg/mL-P	3,0x10 <sup>6</sup>		409,81			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>+</sup> (3) 5µg/mL-P	2,5x10 <sup>6</sup>		443,99			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>+</sup> (4) 5µg/mL-P	2,3x10 <sup>6</sup>		436,00			
293FT/Virgem_SBF <sup>-</sup> (1)	3,0x10 <sup>5</sup>	2,75x10 <sup>5</sup>	18,83	28,73	7,56	26,33
293FT/Virgem_SBF <sup>-</sup> (2)	2,0x10 <sup>5</sup>		30,07			
293FT/Virgem_SBF <sup>-</sup> (3)	3,0x10 <sup>5</sup>		28,82			
293FT/Virgem_SBF <sup>-</sup> (4)	3,0x10 <sup>5</sup>		37,20			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>-</sup> (1) 1µg/mL-P	1,0x10 <sup>6</sup>	5,5x10 <sup>5</sup>	30,10	104,76	52,70	50,31
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>-</sup> (2) 1µg/mL-P	4,0x10 <sup>5</sup>		144,06			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>-</sup> (3) 1µg/mL-P	4,0x10 <sup>5</sup>		139,61			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>-</sup> (4) 1µg/mL-P	4,0x10 <sup>5</sup>		105,27			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>-</sup> (1) 5µg/mL-P	4,0x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>5</sup>	532,76	452,71	101,15	22,34
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>-</sup> (2) 5µg/mL-P	3,0x10 <sup>5</sup>		373,76			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>-</sup> (3) 5µg/mL-P	7,0x10 <sup>5</sup>		547,16			
L17_293FT_GBA_SYN_PM_SBF <sup>-</sup> (4) 5µg/mL-P	2,0x10 <sup>5</sup>		357,17			

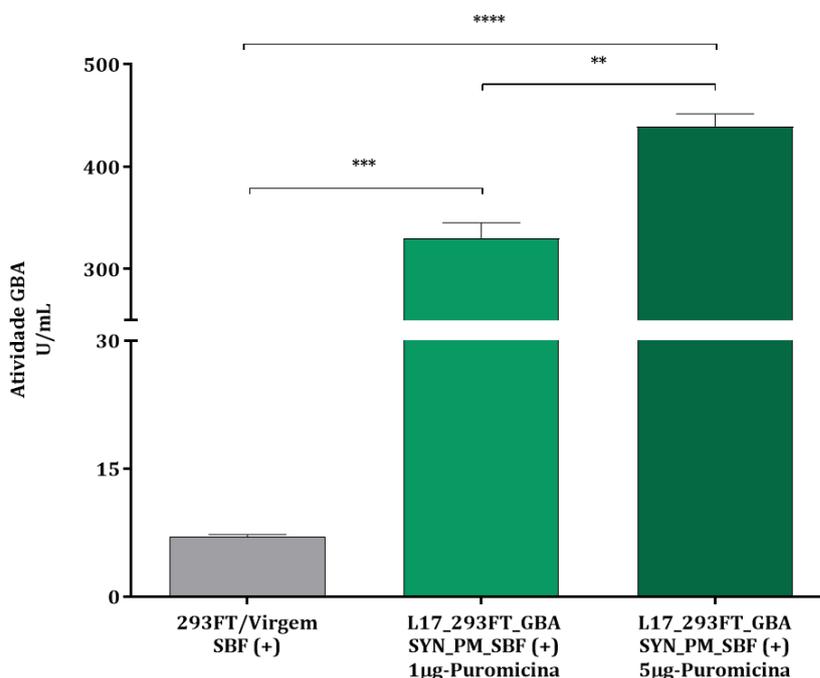
\*Puromicina

Quando avaliada a atividade biológica da GCCase no sobrenadante da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM após tratamento com baixa (1µg/mL) e alta (5µg/mL) concentração do antibiótico puromicina, observamos um aumento da atividade biológica da GCCase quando cultivada em elevada concentração do antibiótico. Com relação a atividade da GCCase após 48h de cultivo em meio DMEM sem SBF pudemos observar os seguintes pontos no que diz respeito a linhagem celular 293FT virgem: não ocorreu crescimento celular, isto é, o número de células após 96 horas foi inferior ou igual ao número de células semeadas e as mesmas apresentaram atividade biológica da *GBA* mais elevada do que esperada, da ordem de 28,73 ( $\pm$  3,78) U/mL. Esses resultados sugerem que outros fatores intrínsecos podem interferir com a elevada atividade biológica da linhagem celular virgem na ausência de SBF e não prosseguimos a análise das células cultivadas nessas condições.

Quanto a linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM pudemos observar que sob essas condições em algumas situações o número de células foi inferior ao número de células semeadas, e em outros casos ocorreu um pequeno crescimento celular após 96 horas (entre 1,3-3,3 vezes). Quanto a produção de GCCase pela linhagem celular L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM foi de 104,8 ( $\pm$  26,35) U/mL após 5 dias de tratamento com 1µg/mL de puromicina e 452,7 ( $\pm$  50,57) U/mL após 5 dias de tratamento com 5µg/mL de puromicina. Assim, nesse caso a atividade de GCCase na linhagem tratada com 1µg/mL em relação a virgem foi de 3,65 vezes mais elevada, porém não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,062$ ), já em relação a tratada com 5µg/mL a diferença foi de 15,8 vezes nos níveis de atividade ( $p = 0,003$ ) das 293FT virgem. Quando comparada à atividade de GCCase na L17 tratada com 1 e 5µg/mL de puromicina, os níveis de atividade após tratamento de alta estrigência foi de 4,3 vezes mais elevado ( $p = 0,002$ ).

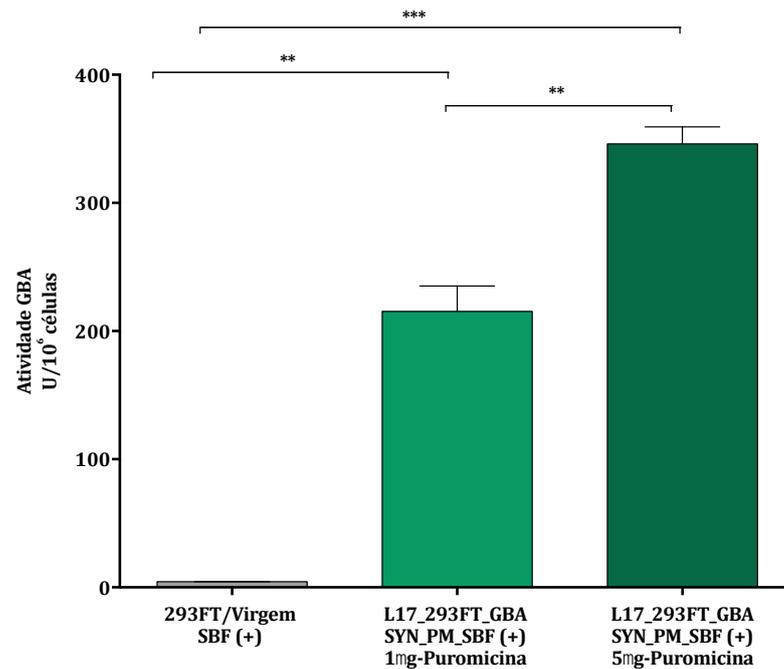
Na Figura 17, podemos observar os níveis de atividade da GCCase sob os mesmos tratamentos de puromicina, porém quando cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SBF. A linhagem 293FT/Virgem apresentou atividade da GCCase da ordem de 7,038 ( $\pm$  0,2) U/mL enquanto que L17 tratada com 1µg/mL de puromicina apresentou níveis de atividade cerca de 47 vezes mais elevado, o que correspondeu a 329,7 ( $\pm$  15,51) U/mL de atividade, o que foi estatisticamente significativo ( $p = 0,0002$ ). O nível de atividade da enzima na linhagem virgem em relação a L17 tratada com 5µg/mL de puromicina também foi estatisticamente significativo ( $p < 0,0001$ ) tendo sido 62 vezes mais elevado, o que correspondeu a um valor de atividade da ordem de 439,5 ( $\pm$  12,03) U/mL. Em relação ao tratamento podemos dizer que o

mesmo foi efetivo uma vez que a diferença de atividade da GCCase no sobrenadante entre a linhagem L17 tratada com 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina foi de 1,3 vezes ( $p = 0,0017$ ).



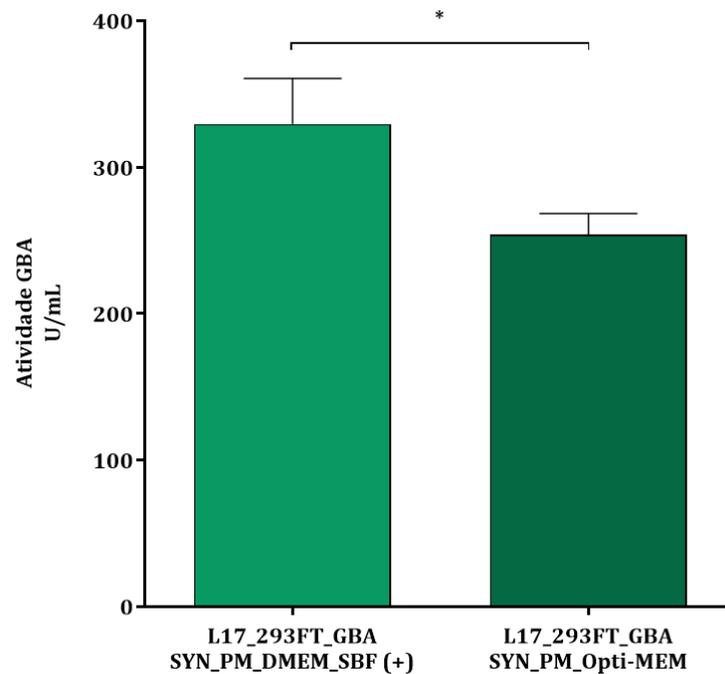
**Figura 17.** Atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM. Níveis de atividade da GCCase em meio DMEM suplementado com 10% SBF. A população mista da linhagem L17 tratada com 5  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina produziu 1,3 vezes mais enzima em relação a mesma linhagem tratada com 1  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina e 62,4 vezes mais que a linhagem virgem. Em relação à virgem, a L17 tratada com 1  $\mu\text{g/mL}$  de antibiótico apresentou níveis de atividade da GCCase 46,8 vezes mais elevado.

Essas informações, levou-nos também a determinar a produtividade da linhagem celular L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM na presença de SBF e tratadas com 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina. Conforme mostra a Figura 18, quando corrigida a atividade de GCCase por milhão de células, a linhagem celular L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM apresentou níveis mais elevados de atividade de GCCase no sobrenadante celular quando comparada com a linhagem celular virgem não tratada independente da dose de puromicina. Com 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina a produção de GCCase pela linhagem transgênica foi 215,4 ( $\pm 19,73$ ) U GBA/ $10^6$  células e 341,7 ( $\pm 13,14$ ) U GBA/ $10^6$  células, respectivamente, enquanto a célula virgem mostrou níveis de GCCase da ordem de 4,439 ( $\pm 0,1$ ) U GBA/ $10^6$  células. Esses dados mostram que após o tratamento com 1  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina ocorreu um aumento da produtividade de 48,5 vezes ( $p = 0,0017$ ) e após o tratamento com 5  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina o aumento da produtividade foi da ordem de 78 vezes ( $p = 0,0001$ ).



**Figura 18.** Atividade biológica da GCase no sobrenadante celular da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM no meio extracelular corrigido por milhão de células após o tratamento com 1 e 5 µg/mL do antibiótico puromicina.

Outro ponto investigado foi a produção de GCase pela linhagem celular L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM cultivada em meio de cultura sem adição de soro fetal bovino conhecido como OPTIMEN. Quando comparada a mesma linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM cultivada em meio DMEM suplementado com 10% SBF e em meio Opti-MEM foi possível observar uma diferença de atividade de 1,3 vezes mais elevada em DMEM com 10% SBF em relação ao cultivo em Opti-MEM, como pode ser observado na Figura 19 ( $p = 0,0101$ ).



**Figura 19.** Atividade biológica da GCCase. Níveis de atividade biológica da GCCase no sobrenadante da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM em meio DMEM com 10% SBF e em meio Opti-MEM.

Os resultados obtidos do cultivo da mesma linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM em meio DMEM e em meio Opti-MEM, mostraram que foi obtido níveis mais elevados de GCCase no sobrenadante da linhagem cultivada em meio DMEM e assim, foi dada continuidade nos experimentos apenas em meio DMEM.

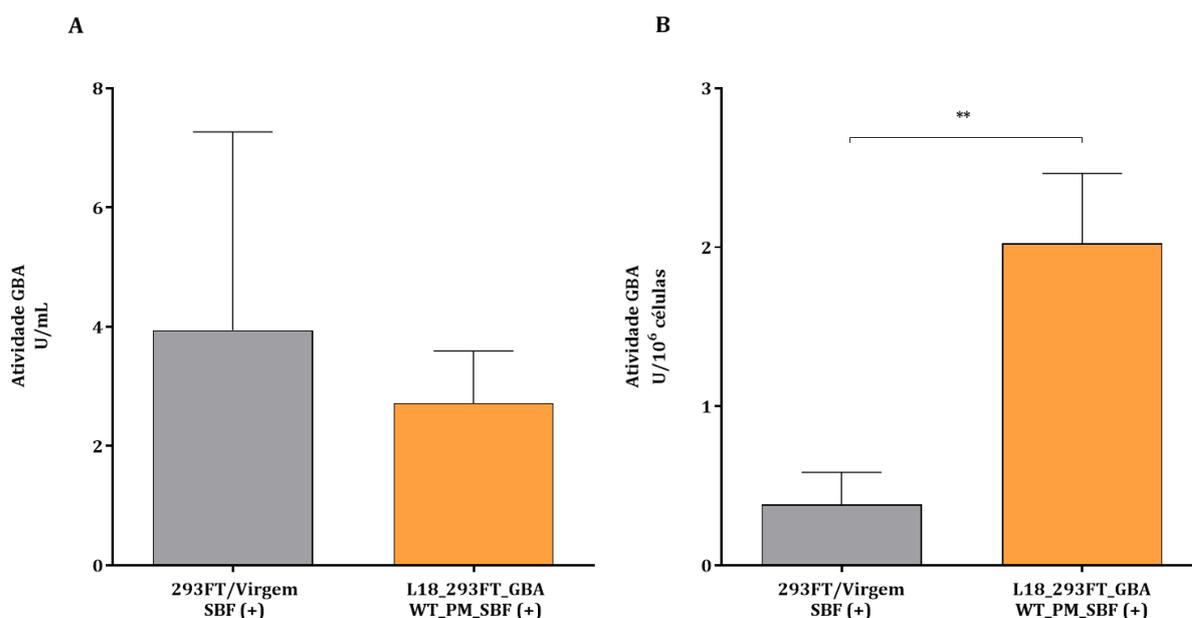
### 6.3.3 Produção da GCCase pela população mista da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM tratada com o antibiótico puromicina

Após a realização do sexto ciclo de transdução lentiviral, a linhagem foi expandida e tratada por 10 dias com 2µg/mL de puromicina. A análise da atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular foi realizada 48h após trocar o meio por meio DMEM com SBF. A Tabela 12 a seguir mostra os resultados obtidos.

**Tabela 12.** Dados de atividade biológica da GCase no sobrenadante da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM após 48h de cultivo em meio DMEM na presença de SBF, e a produtividade da mesma por milhão de células.

Amostra	Nº de células após 96h	Atividade Biológica (U/mL)	Atividade (U/10 <sup>6</sup> células)	Desvio Padrão	CV%
<b>293FT/Virgem_SBF<sup>+</sup> (1)</b>	3,7x10 <sup>6</sup>	1,218	0,356	0,29	34,07
<b>293FT/Virgem_SBF<sup>+</sup> (2)</b>	5,0x10 <sup>6</sup>	0,59			
<b>293FT/Virgem_SBF<sup>+</sup> (3)</b>	4,5x10 <sup>6</sup>	0,922			
<b>293FT/Virgem_SBF<sup>+</sup> (4)</b>	5,8x10 <sup>6</sup>	0,649			
<b>L18_293FT_GBA_WT_PM_SBF<sup>+</sup> (1)</b>	2,8x10 <sup>6</sup>	3,095	2,050	0,88	32,20
<b>L18_293FT_GBA_WT_PM_SBF<sup>+</sup> (2)</b>	2,9x10 <sup>6</sup>	2,376			
<b>L18_293FT_GBA_WT_PM_SBF<sup>+</sup> (3)</b>	2,9x10 <sup>6</sup>	3,71			
<b>L18_293FT_GBA_WT_PM_SBF<sup>+</sup> (4)</b>	2,0x10 <sup>6</sup>	1,691			

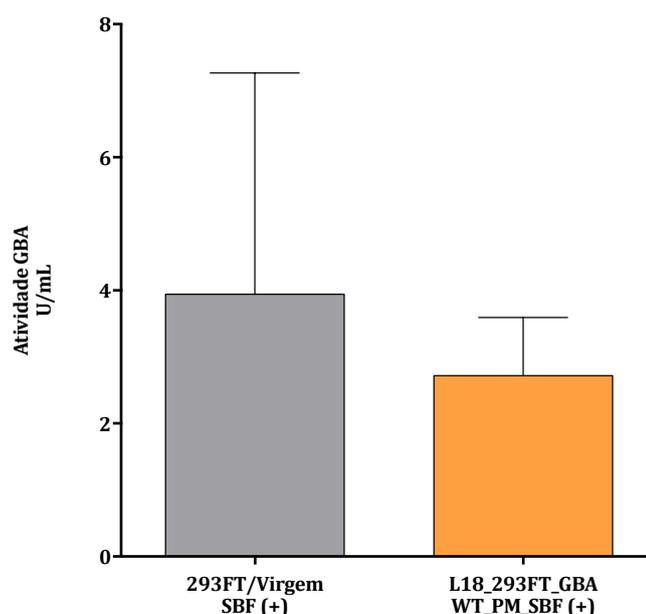
A atividade biológica da GCase no sobrenadante da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM, sob as condições de cultivo descritas acima, foi da ordem de 2,72 ( $\pm 0,44$ ) U/mL o que corresponde a 3 vezes mais em comparação com os níveis da enzima na linhagem virgem sob as mesmas condições de cultivo, que obteve atividade da ordem de 0,84 ( $\pm 0,14$ ) U/mL, o que foi estatisticamente significativo ( $p = 0,018$ ) (Figura 20A). As mesmas análises de atividade, corrigida pelo número de células, pode ser observada na Figura 20B. Neste caso a linhagem virgem apresentou atividade da ordem de 0,38 ( $\pm 0,10$ ) U/10<sup>6</sup> células e a linhagem L18 2,03 ( $\pm 0,22$ ) U/10<sup>6</sup> células, cerca de 5,3 vezes mais, o que foi estatisticamente significativo ( $p = 0,002$ ).



**Figura 20.** Atividade biológica da GCase no sobrenadante celular da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM na presença de SBF. (A) A população mista da linhagem L18 apresentou níveis de atividade 3 vezes mais elevado em relação a virgem; (B) Os níveis de atividade de GCase por milhão de células da população mista da linhagem L18 foi 5,3 vezes mais elevado em comparação com a linhagem virgem.

Outro ponto curioso observado foi a diferença da taxa de crescimento celular da linhagem celular 293FT virgem entre os dois ensaios realizados após 96 horas com SBF. No primeiro ensaio (Tabela 11) a taxa de crescimento da linhagem celular virgem foi da ordem de 10,58 vezes, enquanto nesse segundo ensaio (Tabela 12) a taxa de crescimento da linhagem 293FT virgem foi da ordem de 15,8 vezes. Com relação ao nível de GCase no sobrenadante pudemos observar que na situação com maior crescimento celular a produção de GCase no sobrenadante foi 0,844 ( $\pm 0,14$ ) U GBA/mL e no ensaio com menor crescimento celular (Tabela 11) a produção de GCase no sobrenadante foi 7,04 ( $\pm 0,2$ ) U GBA/mL, cerca de 8,3 vezes maior. Esses dados sugerem que para o crescimento *in vitro* e produção apropriada da enzima GCase sob essas condições (placa de 6 poços com 2mL de meio DMEM 10% SBF por um período de 96 horas) há um limite do número de células para o desempenho apropriado da capacidade biológica da linhagem 293FT virgem.

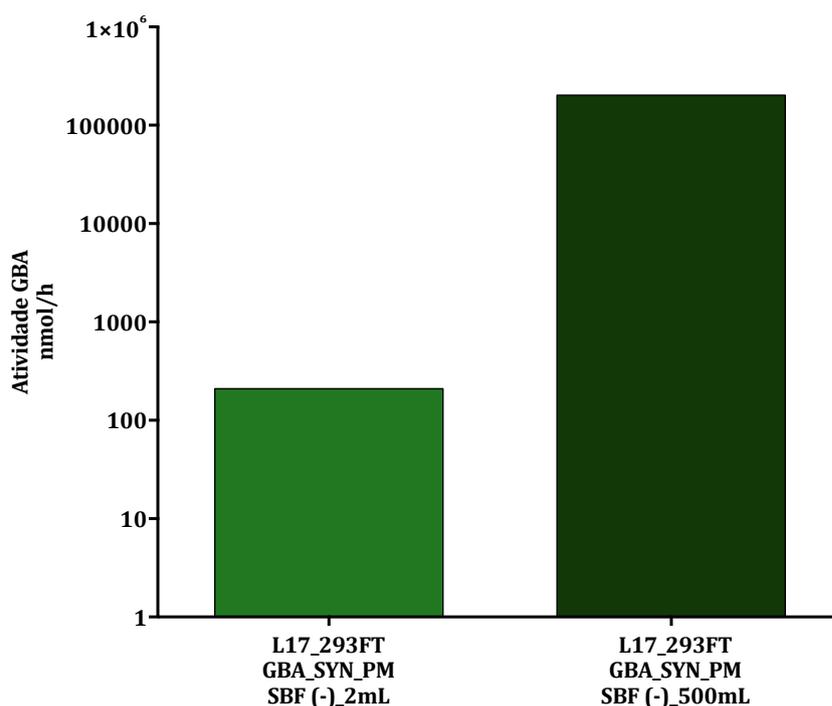
Esses dados levaram-nos a comparar o nível de GCase da célula virgem dos dois ensaios com o nível de GCase da linhagem celular L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM recém gerada. Conforme mostra a Figura 21, a linhagem 293FT virgem produz 4,94 ( $\pm 1,17$ ) U GBA/mL, enquanto a linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM produz 2,71 ( $\pm 0,4$ ) U GBA/mL. Essa diferença não é significativa ( $p = 0,35$ ).



**Figura 21.** Atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM em comparação com a atividade da GCCase no sobrenadante da linhagem 293FT virgem. A população mista da linhagem L18 apresentou níveis de atividade 1,4 vezes inferior em relação a célula virgem.

#### 6.3.4 Escalonamento da produção da GCCase no sobrenadante da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM

Diante desses resultados prosseguimos para o cultivo em larga escala da linhagem celular L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM. Ensaio de atividade biológica também foram realizados em garrafas de 10 andares (1720 cm<sup>2</sup>) com o intuito de avaliar se a atividade enzimática observada em pequena escala (2mL) se mantém quando escalonado o cultivo das linhagens geradas. A linhagem foi inicialmente tratada por 5 dias com 2µg/mL de puromicina e posteriormente expandidas para obtenção do número de células suficiente para plaqueamento nas garrafas de 10 andares (2x10<sup>7</sup> células). O meio de cultivo foi trocado por meio DMEM sem SBF e a coleta do sobrenadante foi realizada após 72h. Após a coleta do sobrenadante, o mesmo foi armazenado em tubos *Falcon* de 50mL em *freezer* -80°C até o momento da análise e as células foram contadas. Em 2mL de sobrenadante foi observada atividade da ordem de 209,52 nmol/h para a linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM e 201931 nmol/h quando expandida a produção para garrafa de 10 andares (500mL de sobrenadante) (Figura 22). Os resultados apresentados mostraram atividade biológica de GCCase da ordem de 104,8 U/mL em placa de 6 poços e da ordem de 403,9 U/mL em garrafa de 10 andares para a linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM. Esses resultados foram satisfatórios uma vez que mostramos ser possível a expansão da produção da GCCase pelas linhagens geradas em sistemas de produção de larga escala.



**Figura 22.** Atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular. Atividade biológica da *GBA* em meio de cultivo DMEM sem SBF da população mista L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM em sistemas de pequena (2mL) e larga escala (500mL).

## 6.4 GERAÇÃO DE CLONES CELULARES DAS LINHAGENS

### L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM e L18\_293-T\_GBA\_WT\_PM

Nosso próximo passo foi a realização da seleção clonal a partir de uma única célula, a fim de obter populações celulares homogêneas e melhor caracterização da produção de GCCase por essas populações celulares.

#### 6.4.1 Análise e Seleção dos Clones celulares pela atividade biológica da GCCase no sobrenadante das linhagens L17\_293-T\_GBA\_SYN\_PM e L18\_293-T\_GBA\_WT\_PM

Foram isolados 18 clones a partir da população mista de L18 pelo método de crescimento a partir de uma única célula, desses apenas 13 prosseguiram para a fase de avaliação. Da linhagem L17 também foram isolados 18 e avaliados 11. Para selecionar os clones com níveis mais elevados de atividade enzimática, os mesmos foram tratados previamente com o agente de seleção, o antibiótico puromicina (2µg/mL) por 5 dias e expandidos em meio de cultura. Em seguida, foram plaqueadas  $3 \times 10^5$  células de cada clone em placas de 6 poços, cultivados em DMEM com 10% SBF, o meio foi trocado por meio fresco 48h após o plaqueamento, e após mais 48h o sobrenadante celular foi coletado para análise de atividade

biológica da GCase. A Tabela 13 e 14 mostram os valores de atividade obtido pelos clones das linhagens L18 e L17, respectivamente.

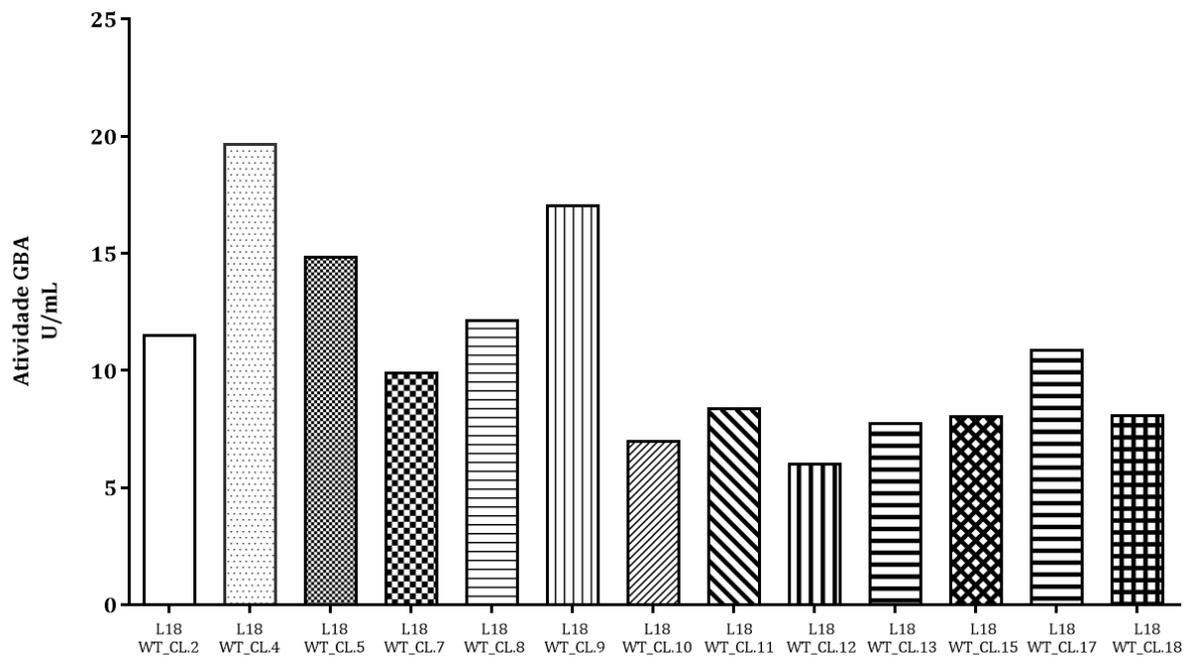
**Tabela 13.** Dados de atividade biológica da GCase no sobrenadante celular dos clones da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT após 48h de cultivo em meio DMEM (10% SBF), e a atividade dos mesmos por milhão de células.

<b>Amostra</b>	<b>Nº de células após 96h</b>	<b>Atividade Biológica (U/mL)</b>	<b>Atividade (U/10<sup>6</sup> células)</b>
L18_293FT_GBA_WT_CL.2_SBF <sup>+</sup>	4,92x10 <sup>6</sup>	14,948	6,076
L18_293FT_GBA_WT_CL.4_SBF <sup>+</sup>	4,68x10 <sup>6</sup>	19,725	8,430
L18_293FT_GBA_WT_CL.5_SBF <sup>+</sup>	5,28x10 <sup>6</sup>	14,884	5,638
L18_293FT_GBA_WT_CL.7_SBF <sup>+</sup>	3,66x10 <sup>6</sup>	9,955	5,440
L18_293FT_GBA_WT_CL.8_SBF <sup>+</sup>	4,98x10 <sup>6</sup>	12,213	4,905
L18_293FT_GBA_WT_CL.9_SBF <sup>+</sup>	4,14x10 <sup>6</sup>	17,076	8,249
L18_293FT_GBA_WT_CL.10_SBF <sup>+</sup>	3,48x10 <sup>6</sup>	7,028	4,039
L18_293FT_GBA_WT_CL.11_SBF <sup>+</sup>	4,26x10 <sup>6</sup>	8,414	3,950
L18_293FT_GBA_WT_CL.12_SBF <sup>+</sup>	3,54x10 <sup>6</sup>	6,061	3,424
L18_293FT_GBA_WT_CL.13_SBF <sup>+</sup>	4,44x10 <sup>6</sup>	7,778	3,504
18_293FT_GBA_WT_CL.15_SBF <sup>+</sup>	3,72x10 <sup>6</sup>	8,079	4,343
L18_293FT_GBA_WT_CL.17_SBF <sup>+</sup>	4,44x10 <sup>6</sup>	10,910	4,914
L18_293FT_GBA_WT_CL.18_SBF <sup>+</sup>	3,42x10 <sup>6</sup>	8,133	4,756

**Tabela 14.** Dados de atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular dos clones da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN após 48h de cultivo em meio DMEM (10% SBF), e a atividade dos mesmos por milhão de células.

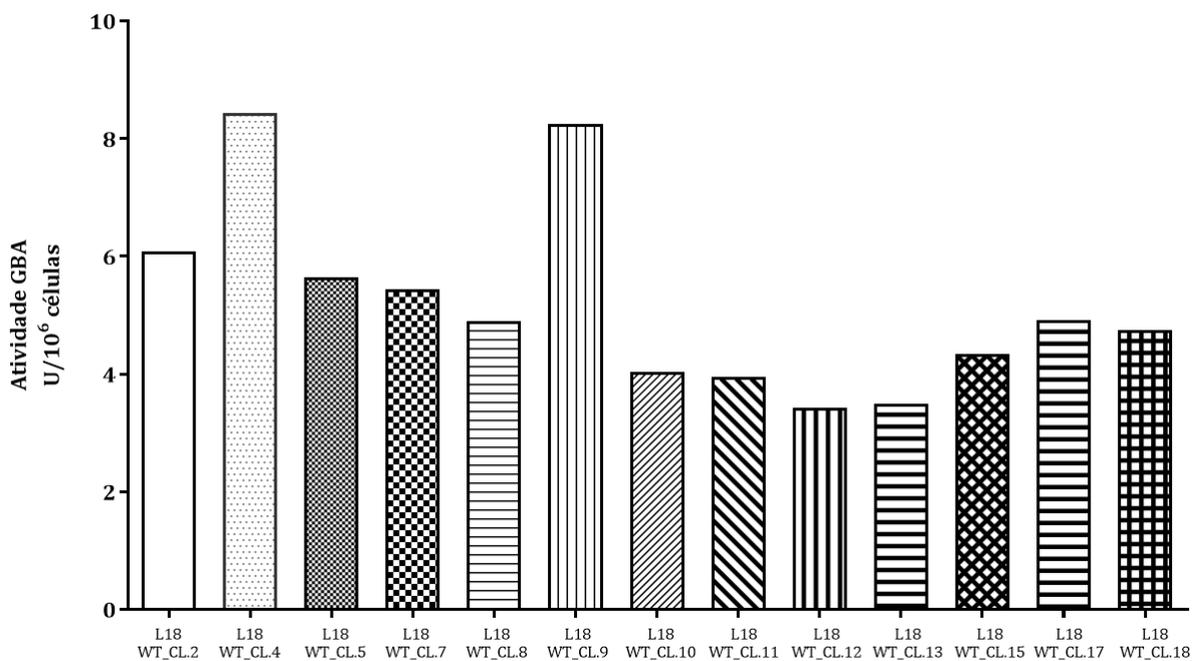
<b>Amostra</b>	<b>Nº de células após 96h</b>	<b>Atividade Biológica (U/mL)</b>	<b>Atividade (U/10<sup>6</sup> células)</b>
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.5_SBF<sup>+</sup></b>	2,1x10 <sup>6</sup>	265,087	252,464
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.7_SBF<sup>+</sup></b>	1,4x10 <sup>6</sup>	89,911	128,444
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.8_SBF<sup>+</sup></b>	3,4x10 <sup>6</sup>	230,045	135,320
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.9_SBF<sup>+</sup></b>	3x10 <sup>6</sup>	301,160	200,773
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.10_SBF<sup>+</sup></b>	3,3x10 <sup>6</sup>	118,907	72,065
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.11_SBF<sup>+</sup></b>	2,6x10 <sup>6</sup>	285,561	219,662
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.13_SBF<sup>+</sup></b>	3,2x10 <sup>6</sup>	440,955	275,597
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.15_SBF<sup>+</sup></b>	3x10 <sup>6</sup>	585,464	390,310
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.16_SBF<sup>+</sup></b>	3x10 <sup>6</sup>	683,952	455,968
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.17_SBF<sup>+</sup></b>	2,9x10 <sup>6</sup>	207,610	143,180
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.18_SBF<sup>+</sup></b>	3,1x10 <sup>6</sup>	167,931	108,342

As análises de atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular dos clones da linhagem L18. Foram obtidas as análises de atividade para 13 clones e, dentre eles a atividade variou de 6,06 U/mL (clone 12) a 19,7 U/mL (clone 4) (Figura 23). Os dois clones que apresentaram os maiores níveis de atividade de GCCase foram os clones 4 (19,7 U/mL) e o clone 9 (17,07 U/mL).



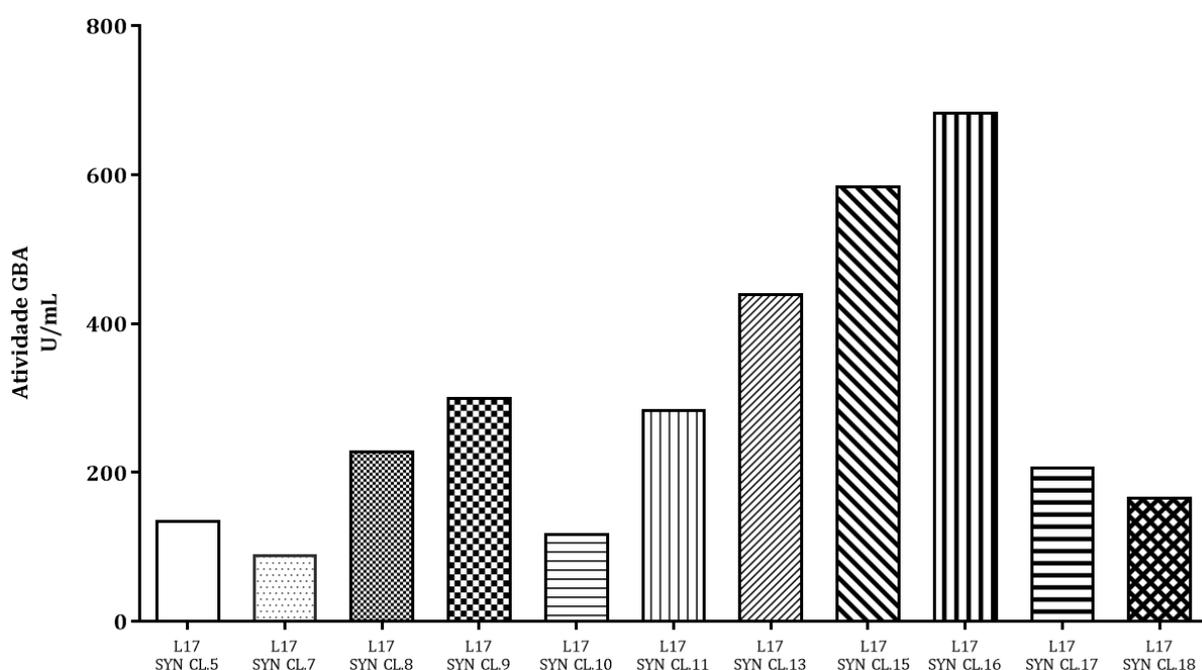
**Figura 23.** Atividade biológica da GCCase. Níveis de atividade biológica da GCCase no meio extracelular dos 13 clones da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT.

Quando corrigida a atividade de GCCase por milhão de células os clones 4 e 9 continuaram apresentando os níveis mais elevados de atividade de GCCase no sobrenadante celular com 8,4 e 8,2 U/10<sup>6</sup> células, respectivamente. Essa mesma relação não se manteve para todos clones, mas de maneira geral não houve uma mudança significativa. Os dados de atividade por milhão de células, pode ser visto na Figura 24.



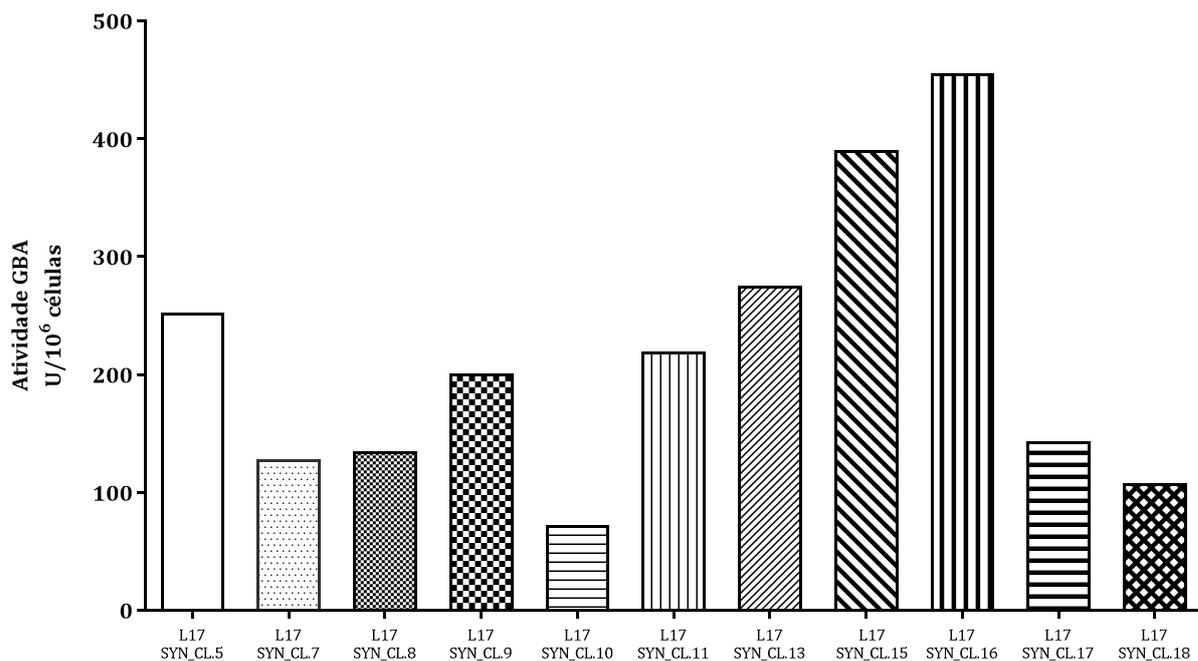
**Figura 24.** Atividade biológica da GCCase. Níveis de atividade biológica da GCCase no meio extracelular dos 13 clones da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT corrigido por milhão de células.

As análises de atividade biológica da GCCase no sobrenadante celular dos clones da linhagem L17 foram realizadas 48h após trocar o meio. Foram obtidas as análises de atividade extracelular para 11 clones e, dentre eles a atividade variou de 89,9 U/mL (clone 7) a 683,9 U/mL (clone 16) (Figura 25). Os dois clones que apresentaram os maiores níveis de atividade da GCCase no sobrenadante foram os clones 15 (585,4 U/mL) e o clone 16 (683,9 U/mL). A diferença nos níveis de atividade foi de 7,6 vezes mais atividade do clone 16 (mais produtivo) em relação ao clone 7 (menos produtivo). Em comparação entre os melhores clones das linhagens L17 e L18, o clone 16 da L17 foi 34,7 vezes mais produtivo em comparação com o clone 4 da L18.



**Figura 25.** Atividade biológica da GCCase. Níveis de atividade biológica da GCCase no meio extracelular dos 11 clones da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN.

Quando corrigida a atividade de GCCase por milhão de células os clones 15 e 16 da L17 continuaram apresentando os níveis mais elevados de atividade da GCCase com 390,3 e 455,9 U/10<sup>6</sup> células, respectivamente. Essa mesma relação não se manteve para todos clones, mas de maneira geral não houve uma mudança significativa. Os dados de atividade por milhão de células, pode ser visto na Figura 26.



**Figura 26.** Atividade biológica da GCCase. Níveis de atividade biológica da GCCase no meio extracelular dos 11 clones da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN corrigido por milhão de células.

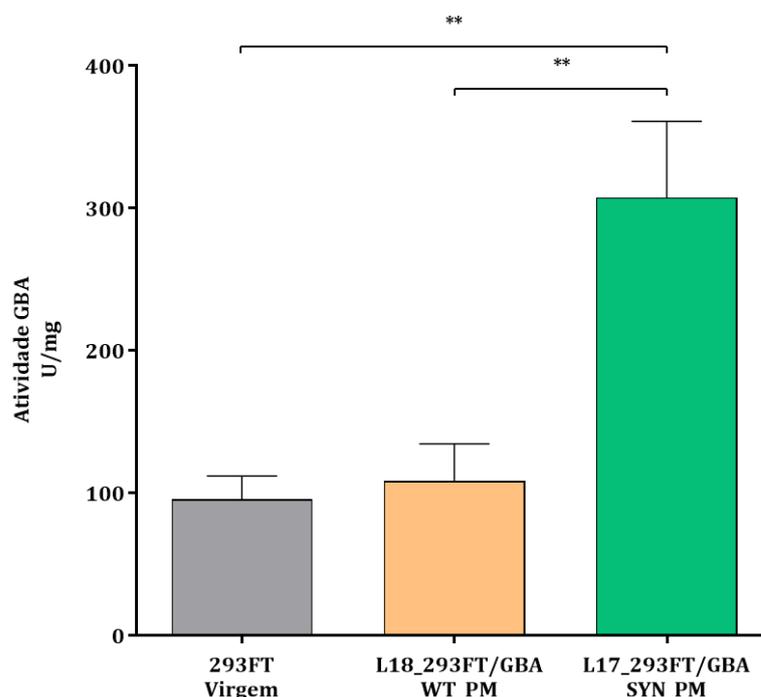
#### 6.4.2 Produção da GCCase intracelular pela população mista e por clones selecionados das linhagens L17\_293FT\_GBA\_SYN e L18\_293FT\_GBA\_WT

Realizamos a avaliação da GCCase intracelular dos melhores clones derivados das linhagens L17 e L18, juntamente com as populações mistas e linhagem 293FT/Virgem. As linhagens foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SBF e trocou-se o meio após 48h. Depois de mais 48h foi realizada a coleta do lisado celular para análise de atividade biológica intracelular. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 15 e foram corrigidos pela quantidade de proteína total, previamente quantificada pelo método de Lowry.

**Tabela 15.** Atividade biológica intracelular da GCase nas linhagens 293FT/Virgem, L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM e L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM e dos dois clones mais produtivos de cada uma das linhagens, após 48h de cultivo em DMEM (10% SBF), corrigida pela proteína total, ou seja, atividade específica.

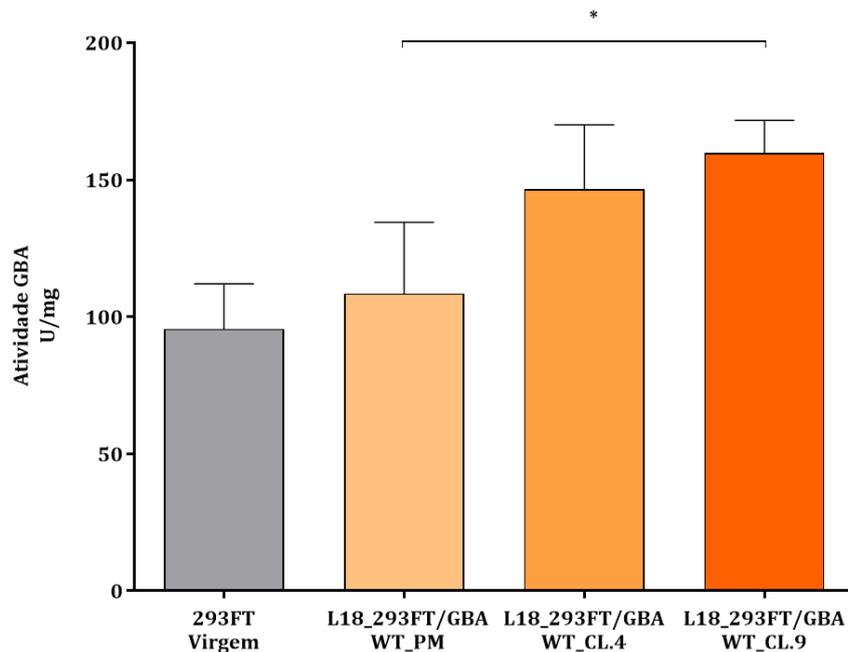
Amostra	Nº de células após 96h	Proteína Total - Lowry (mg/mL)	Atividade Biológica (U/mg)	Desvio Padrão	CV%
<b>Leucócitos</b>	----	2,51	12,865	----	----
<b>293FT/Virgem (1)</b>	2,55x10 <sup>6</sup>	7,74	74,406	16,50	17,26
<b>293FT/Virgem (2)</b>	2,95x10 <sup>6</sup>	11,06	93,684		
<b>293FT/Virgem (3)</b>	3,55x10 <sup>6</sup>	7,61	100,089		
<b>293FT/Virgem (4)</b>	3,85x10 <sup>6</sup>	5,77	114,135		
<b>L18_293FT_GBA_WT_PM (1)</b>	3,6x10 <sup>6</sup>	7,51	86,213	26,09	24,06
<b>L18_293FT_GBA_WT_PM (2)</b>	4,05x10 <sup>6</sup>	5,77	118,338		
<b>L18_293FT_GBA_WT_PM (3)</b>	2,85x10 <sup>6</sup>	4,50	140,764		
<b>L18_293FT_GBA_WT_PM (4)</b>	4,1x10 <sup>6</sup>	8,86	88,327		
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.4 (1)</b>	5,5x10 <sup>6</sup>	4,71	162,212	23,60	16,11
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.4 (2)</b>	3,7x10 <sup>6</sup>	8,50	119,607		
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.4 (3)</b>	3,75x10 <sup>6</sup>	4,76	169,968		
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.4 (4)</b>	2,85x10 <sup>6</sup>	5,59	134,238		
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.9 (1)</b>	3,95x10 <sup>6</sup>	7,10	156,201	11,92	7,46
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.9 (2)</b>	3,75x10 <sup>6</sup>	6,16	146,671		
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.9 (3)</b>	4,2x10 <sup>6</sup>	4,92	161,014		
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.9 (4)</b>	3,9x10 <sup>6</sup>	4,71	175,274		
<b>L17_293FT_GBA_SYN_PM (1)</b>	4,6x10 <sup>6</sup>	10,36	248,834	53,49	17,39
<b>L17_293FT_GBA_SYN_PM (2)</b>	3,25x10 <sup>6</sup>	5,98	275,523		
<b>L17_293FT_GBA_SYN_PM (3)</b>	3,35x10 <sup>6</sup>	5,51	351,083		
<b>L17_293FT_GBA_SYN_PM (4)</b>	2,45x10 <sup>6</sup>	6,24	354,609		
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.15 (1)</b>	3,85x10 <sup>6</sup>	5,46	808,893	371,75	63,40
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.15 (2)</b>	3,45x10 <sup>6</sup>	7,30	612,007		
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.15 (3)</b>	3,95x10 <sup>6</sup>	5,98	870,621		
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.15 (4)</b>	3,85x10 <sup>6</sup>	5,44	53,812		
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.16 (1)</b>	3,7x10 <sup>6</sup>	4,81	916,86	152,10	20,22
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.16 (2)</b>	3,55x10 <sup>6</sup>	4,84	822,35		
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.16 (3)</b>	4,1x10 <sup>6</sup>	6,78	705,545		
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.16 (4)</b>	4,2x10 <sup>6</sup>	9,01	564,598		

As análises de atividade biológica intracelular das linhagens geradas, mostrou atividade da GCase de 95,58 ( $\pm$  8,249) U/mg de proteína para a linhagem virgem, 108,4 ( $\pm$  13,04) U/mg de proteína para a população mista da linhagem L18 e de 307,5 ( $\pm$  26,74) U/mg de proteína para a população mista da linhagem L17, (Figura 27). Não houve diferença estatisticamente significativa entre virgem e L18 ( $p = 0,4431$ ), mas entre virgem e a L17 foi observada diferença significativa ( $p = 0,0026$ ) sendo que a L17 apresentou atividade 3,21 vezes mais elevada em comparação com virgem. Entre a população mista de L17 e L18 também foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0019$ ) sendo 2,84 vezes mais produtiva a linhagem L17 em relação a L18.



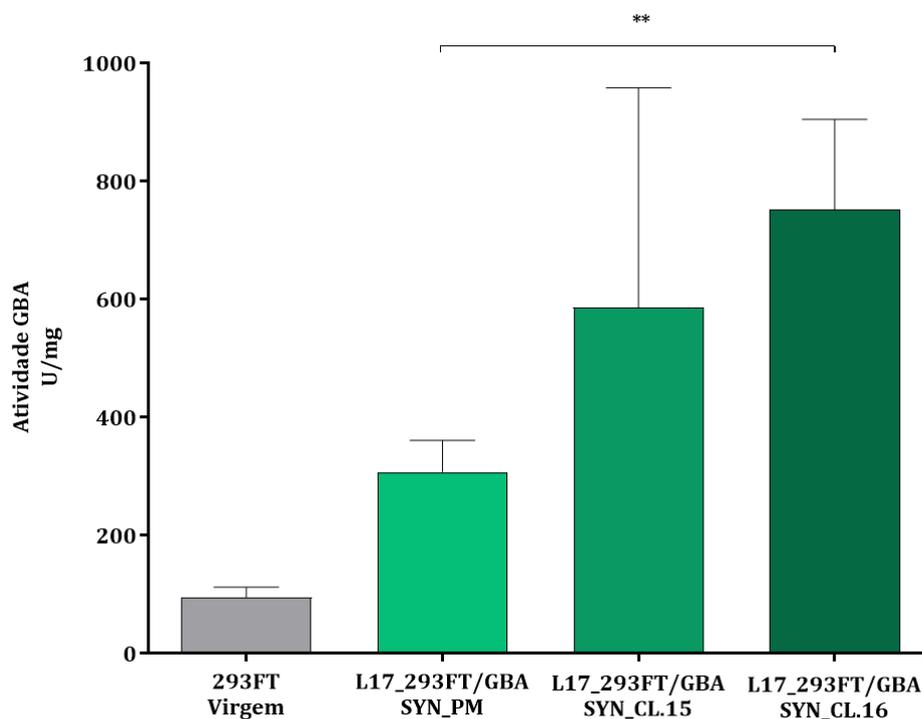
**Figura 27.** Atividade específica da enzima recombinante GCase produzida pelas linhagens L18 e L17. A população mista da L18 apresentou atividade da GCase cerca de 1,13 vezes mais elevada em comparação com a linhagem virgem e a L17 obteve uma produtividade de 3,2 vezes mais que a virgem. Entre a população mista de L17 e L18 a diferença foi de 2,84 vezes mais na linhagem L17 em relação a L18.

A atividade intracelular da GCase para o clone 4 da L18 foi de 146,5 ( $\pm$  11,80) U/mg o que representa cerca de 1,35 vezes mais em relação a atividade para a população mista da mesma linhagem L18, porém estatisticamente os valores não foram significativos ( $p = 0,0739$ ). Comparando o clone 9 que apresentou uma atividade enzimática de GCase da ordem de 159,8 ( $\pm$  5,96) U/mg a diferença com o clone 4 não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,3666$ ) porém, quando comparado com a população mista, o clone 9 apresentou níveis de atividade intracelular cerca de 1,5 vezes mais elevado ( $p = 0,0213$ ), como pode ser visto na Figura 28.



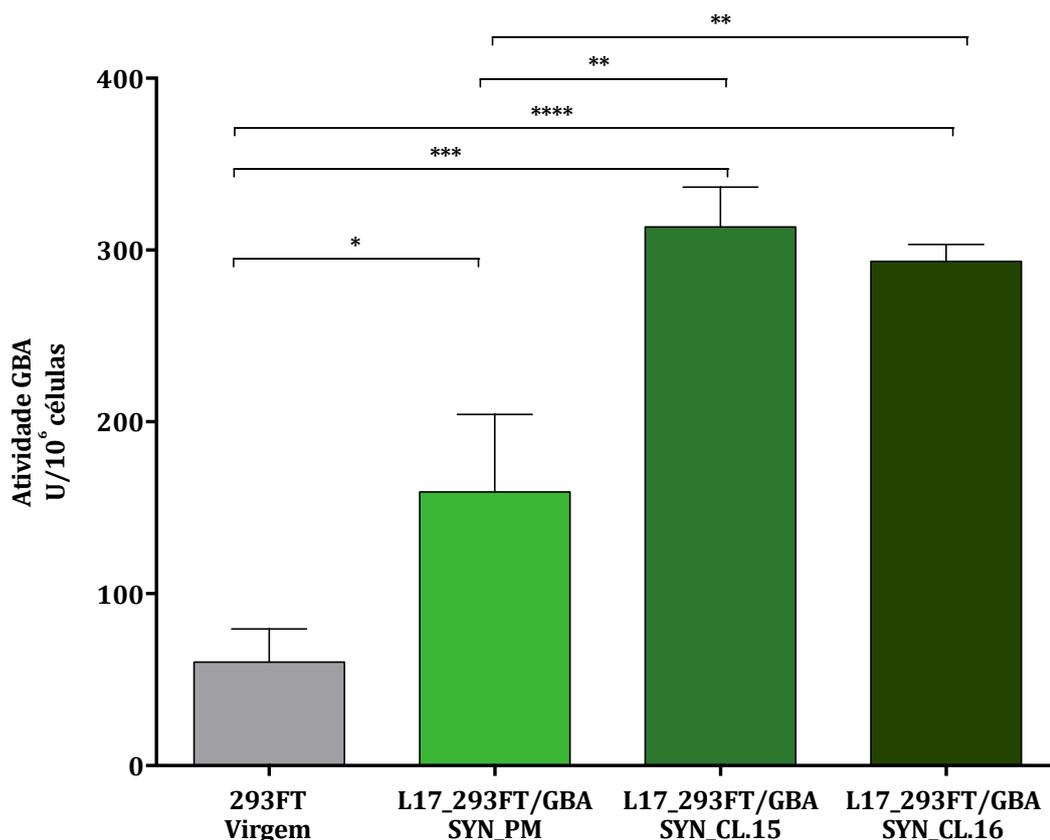
**Figura 28.** A atividade intracelular da GCase para o clone 4 da L18 foi cerca de 1,35 vezes maior em relação à produção da população mista da mesma linhagem L18. Comparando o clone 9 com o clone 4, a diferença não foi estatisticamente significativa, mas em comparação com a população mista, o clone 9 apresentou atividade intracelular da GCase 1,5 vezes mais elevada.

A análise de atividade intracelular da GCase para a população mista da linhagem L17 foi de  $307,5 (\pm 26,74)$  U/mg e para o clone 15 foi de  $586,3 (\pm 185,9)$  U/mg, o que em comparação com a população mista foi cerca de 1,9 vezes mais elevada ( $p = 0,23$ ). Pudemos observar que o clone 16, apresentou atividade enzimática de  $752 (\pm 76,05)$  U/mg, o que representa 2,45 vezes mais em comparação com a população mista ( $p = 0,006$ ) e 1,28 vezes mais em comparação com o clone 15 ( $p = 0,46$ ). Notamos ainda que a produção menor de GCase pelo clone 15 pode ser explicado pelos reduzidos níveis da mesma em uma das culturas ( $53,8$  U GBA/ mg de proteína), enquanto nas demais culturas os níveis de GCase foram cerca de  $763,8 \pm 77,9$  U GBA/mg proteína. A Figura 29 ilustra os níveis da atividade específica de GCase pela linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM, seus dois clones (L17\_293FT\_GBA\_SYN\_CL.15 e L17\_293FT\_GBA\_SYN\_CL.16) e a linhagem celular virgem.



**Figura 29.** A atividade intracelular da GCase para o clone 16 da L17 foi 2,45 vezes mais elevada em comparação com a produção da população mista ( $p = 0,0064$ ) e 1,28 vezes maior em comparação com o produzido pelo clone 15. Quando o clone 15 foi comparado com a população mista, este produziu 1,9 vezes mais atividade intracelular da GCase ( $p = 0,23$ ).

Essas informações levaram-nos a determinar a atividade biológica de *GBA* intracelular pelo número de células presentes em cada cultura celular para a linhagem celular L17\_293FT\_GBA\_SYN e seus dois clones mais produtivos (clones 15 e 16). Assim, antes da obtenção do extrato proteico total, as células foram lavadas em PBS, coletadas e quantificado o número total de células/cultura celular. A partir desses valores pôde-se obter a produtividade das respectivas linhagens celulares. Conforme mostra a Figura 30, os níveis de produção de *GBA* pela população mista foi  $159,3 (\pm 22,48)$  U GBA/ $10^6$  células, comparado com a célula virgem que mostrou níveis de produção de *GBA* intracelular da ordem de  $60,19 (\pm 9,67)$  U GBA/ $10^6$  células. Isso indica um aumento de produtividade de 2,64 vezes. Esses valores foram significativos (t-test *two sample*,  $p = 0,014$  com teste de *Welch* assumindo as variâncias desiguais). O clone 15 mostrou níveis de produção de *GBA* de  $313,4 (\pm 13,38)$  U GBA/ $10^6$  células e o clone 16 níveis de *GBA* de  $293,3 (\pm 4,91)$  U GBA/ $10^6$  células, cerca de 1,96 vezes e 1,84 vezes, respectivamente maior em relação a população mista. Esses valores foram significativos ( $p = 0,0026$  e  $p = 0,0078$ , respectivamente). Convém ressaltar que para essa análise não avaliamos as medidas de atividade da quarta cultura celular do clone 15. Considerando a diferença observada em relação as demais culturas no momento estamos repetindo esse ensaio.



**Figura 30.** Produtividade da linhagem celular L17\_293FT/GBA\_SYN\_PM, os clones 15 e 16 derivados da mesma e da linhagem celular controle (293FT virgem). O número de unidades de *GBA* biologicamente ativa foram determinadas pelo ensaio fluorimétrico. A produtividade dos clones 15 e 16 são cerca de 1,96 vezes e 1,84 vezes, respectivamente maior comparada a população mista.

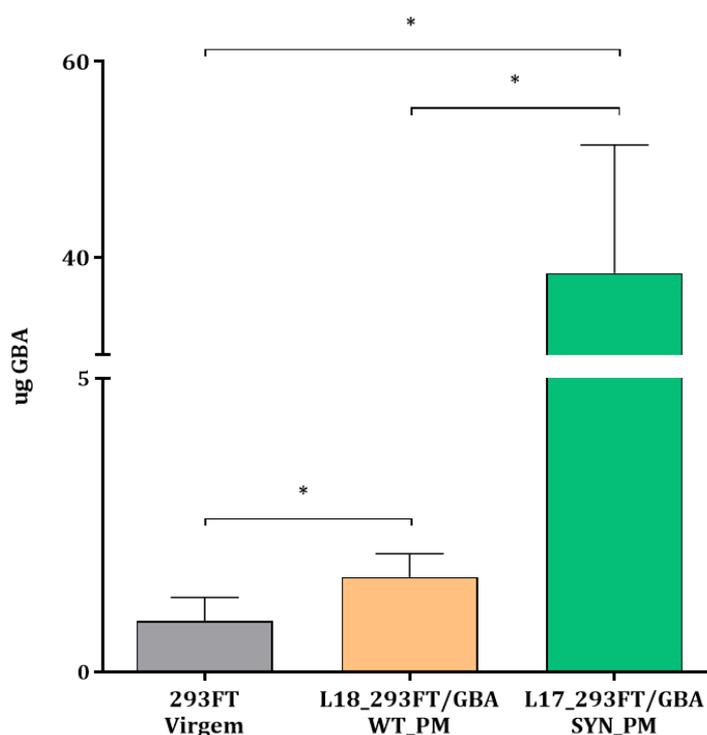
#### 6.4.3 Quantificação da GCase por espectrometria de massa no sobrenadante e no lisado celular das linhagens com produção permanente

Para avaliar com maior precisão a quantidade de GCase produzida pelas linhagens L17 e L18 e seus clones mais produtivos, realizamos a quantificação da GCase presente no sobrenadante e no lisado celular. Para isso, depois de 24h do plaqueamento de  $1 \times 10^6$  células o meio foi trocado por 4mL de DMEM sem SBF e após mais 48h o mesmo foi coletado para quantificação da GCase por espectrometria de massa no sobrenadante celular. O lisado celular foi coletado em um volume final de 250 $\mu$ L de tampão desnaturante. Na Tabela 16 pode-se verificar a quantificação em micrograma ( $\mu$ g) de GCase no sobrenadante e no lisado celular, utilizando os valores médios das duas sequências peptídicas que apresentaram quantificação mais intensa, como também o número de células contados.

**Tabela 16.** Número de células e valores médios obtidos em  $\mu\text{g}$  de GCase pela análise de espectrometria de massa presente no sobrenadante e no lisado celular.

Amostras	Nº de células	Média ( $\mu\text{g}$ ) Sobrenadante	Média ( $\mu\text{g}$ ) Intracelular
293FT/Virgem (1)	$2,2 \times 10^6$	0,574	2,434
293FT/Virgem (2)	$2,15 \times 10^6$	0,563	3,027
293FT/Virgem (3)	$3,95 \times 10^6$	1,413	2,509
293FT/Virgem (4)	$3,35 \times 10^6$	0,947	2,806
		<b>0,874</b>	<b>2,694</b>
L18_293FT_GBA_WT_PM (1)	$2,9 \times 10^6$	2,173	4,316
L18_293FT_GBA_WT_PM (2)	$5,45 \times 10^6$	1,264	3,525
L18_293FT_GBA_WT_PM (3)	$5 \times 10^6$	1,382	2,512
L18_293FT_GBA_WT_PM (4)	$4,85 \times 10^6$	1,644	1,731
		<b>1,616</b>	<b>3,021</b>
L18_293FT_GBA_WT_CL.4 (1)	$1,75 \times 10^6$	0,628	1,812
L18_293FT_GBA_WT_CL.4 (2)	$2,5 \times 10^6$	0,675	3,958
L18_293FT_GBA_WT_CL.4 (3)	$3,2 \times 10^6$	0,596	4,431
		<b>0,633</b>	<b>3,400</b>
L18_293FT_GBA_WT_CL.9 (1)	$5,3 \times 10^6$	1,649	3,541
L18_293FT_GBA_WT_CL.9 (2)	$3,9 \times 10^6$	1,186	2,690
L18_293FT_GBA_WT_CL.9 (3)	$3,75 \times 10^6$	1,390	3,295
L18_293FT_GBA_WT_CL.9 (4)	$3,45 \times 10^6$	1,934	3,307
		<b>1,540</b>	<b>3,208</b>
L17_293FT_GBA_SYN_PM (1)	$2,65 \times 10^6$	45,958	12,674
L17_293FT_GBA_SYN_PM (2)	$2,7 \times 10^6$	22,636	12,871
L17_293FT_GBA_SYN_PM (3)	$1,65 \times 10^6$	33,137	11,582
L17_293FT_GBA_SYN_PM (4)	$2,4 \times 10^6$	51,837	19,211
		<b>38,392</b>	<b>14,085</b>
L17_293FT_GBA_SYN_CL.15 (1)	$5,6 \times 10^6$	62,686	8,133
L17_293FT_GBA_SYN_CL.15 (2)	$6 \times 10^6$	57,420	4,848
L17_293FT_GBA_SYN_CL.15 (3)	$6,2 \times 10^6$	80,391	6,566
L17_293FT_GBA_SYN_CL.15 (4)	$5,2 \times 10^6$	40,103	5,120
		<b>60,150</b>	<b>6,166</b>
L17_293FT_GBA_SYN_CL.16 (1)	$4,9 \times 10^6$	19,502	5,671
L17_293FT_GBA_SYN_CL.16 (2)	$5,2 \times 10^6$	61,957	6,569
L17_293FT_GBA_SYN_CL.16 (3)	$6,85 \times 10^6$	65,318	5,082
L17_293FT_GBA_SYN_CL.16 (4)	$5 \times 10^6$	66,146	4,023
		<b>53,231</b>	<b>5,336</b>

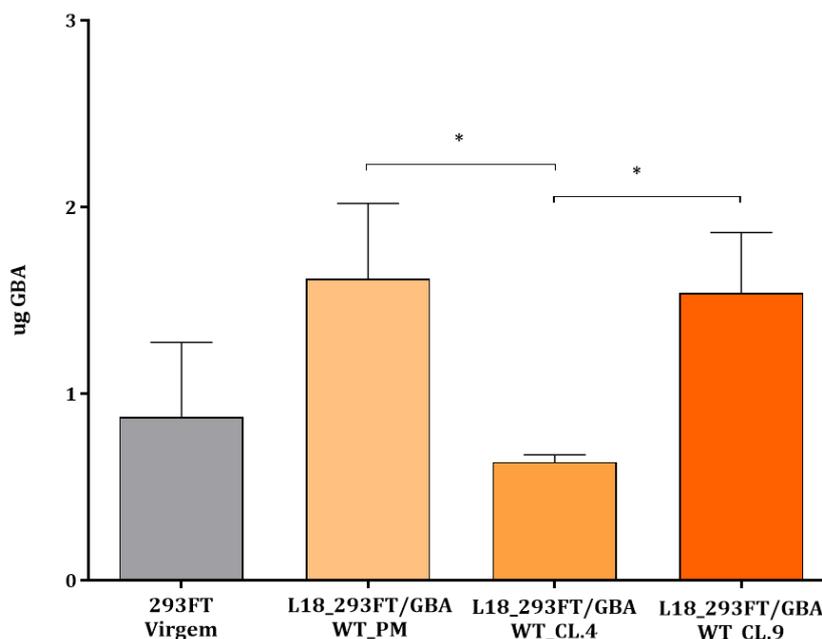
Os resultados de quantificação da GCCase no sobrenadante celular, pela técnica de espectrometria de massa, a partir da média dos valores obtidos pela quantificação dos dois peptídeos mais intensos, mostrou a quantificação da GCCase presente no sobrenadante da população mista da L18 da ordem  $1,62 (\pm 0,20)$   $\mu\text{g}$  de GCCase e cerca de  $38,39 (\pm 6,54)$   $\mu\text{g}$  no sobrenadante da linhagem L17. A linhagem virgem obteve uma quantificação de GCCase secretada da ordem de  $0,874 (\pm 0,20)$   $\mu\text{g}$ . Em uma análise comparativa observamos que a L18 produziu 1,8 vezes mais GCCase que a linhagem virgem ( $p = 0,04$ ) e a L17 cerca de 43,9 vezes mais que a virgem ( $p = 0,011$ ) e, a produção em  $\mu\text{g}$  de GCCase no sobrenadante da L17 em comparação com a L18 foi cerca de 23,7 vezes maior ( $p = 0,011$ ). Os resultados podem ser observados na Figura 31.



**Figura 31.** Concentração em micrograma ( $\mu\text{g}$ ) de GCCase a partir de  $100 \mu\text{g}$  de proteína total presente no sobrenadante da linhagem 293FT/Virgem e das populações mistas L18 e L17. A linhagem 17 produziu 43,9 vezes mais que a virgem e 23,7 vezes mais de *GBA* que a L18. A L18 em comparação com a virgem produziu 1,8 vezes mais de *GBA* no sobrenadante celular.

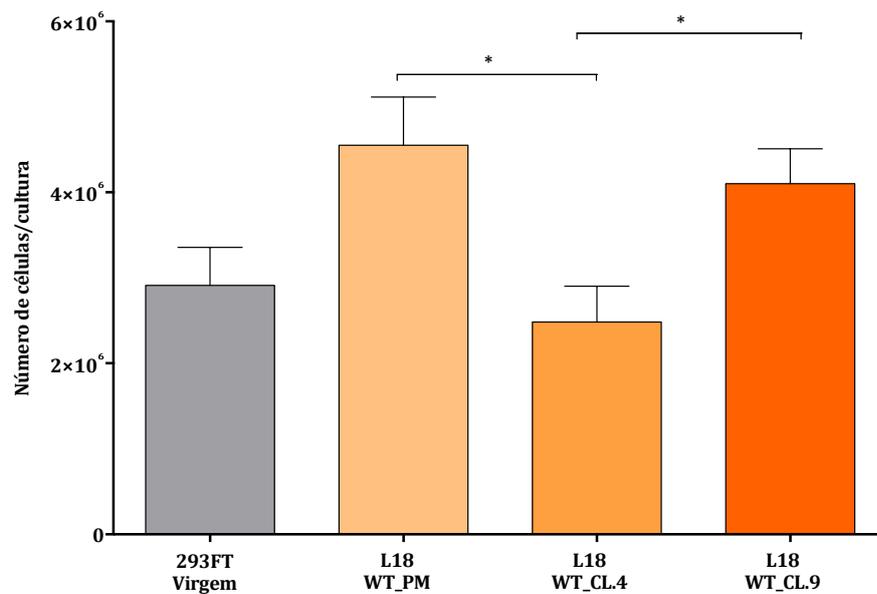
Os resultados de quantificação da GCCase no sobrenadante celular dos clones 4 e 9 da L18 foram da ordem de  $0,63 (\pm 0,023)$  e  $1,54 (\pm 0,16)$   $\mu\text{g}$ , respectivamente. A quantificação da GCCase no sobrenadante da população mista da L18 foi cerca de 2,6 vezes maior em relação ao produzido no sobrenadante do clone 4 ( $p = 0,0159$ ).

Quando comparada a quantificação da *GBA* no sobrenadante da L18 em comparação com o clone 9, a população mista produziu 1,04 vezes mais de GCCase ( $p = 0,78$ ). Já a comparação entre os clones foi significativa, tendo o clone 9 obtido um valor de quantificação de 2,4 vezes mais de GCCase no sobrenadante em relação ao clone 4 ( $p = 0,01$ ), (Figura 32).



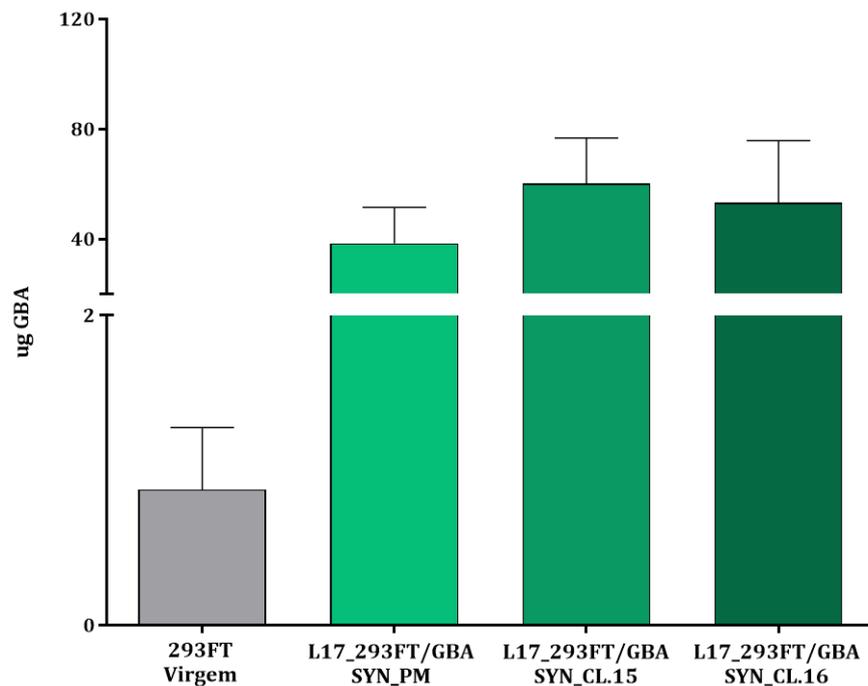
**Figura 32.** Concentração de GCCase a partir de 100 $\mu$ g de proteína total presente no sobrenadante da população mista linhagem 18 e dos clones 4 e 9. A linhagem 18 produziu 2,6 vezes mais que o clone 4 e 1,04 vezes mais que o clone 9. O clone 9 obteve 2,4 vezes mais GCCase no sobrenadante em comparação com o obtido pelo clone 4.

Esses resultados levaram-nos a investigar a relação sobre a quantidade de *GBA* no sobrenadante celular e o número de células presentes por cultura. Conforme demonstrado na Figura 33, de fato as culturas que produzem maior quantidade de *GBA* apresentam maior número de células. Em média o número de células na cultura de 293FT virgem foi 2,91 ( $\pm 0,44$ )  $\times 10^6$  células e na população mista da ordem de 4,5 ( $\pm 0,5$ )  $\times 10^6$  células, porém essa diferença não é significativa ( $p = 0,06$ ). Por outro lado, o número de células na cultura do clone 4 foi 2,48 ( $\pm 0,5$ )  $\times 10^6$  células e do clone 9 foi 4,1 ( $\pm 0,6$ )  $\times 10^6$  células. Essa diferença é significativa ( $p = 0,04$ ). Também foi significativa a diferença do número de células na cultura da população mista e do clone 4 ( $p = 0,03$ ).



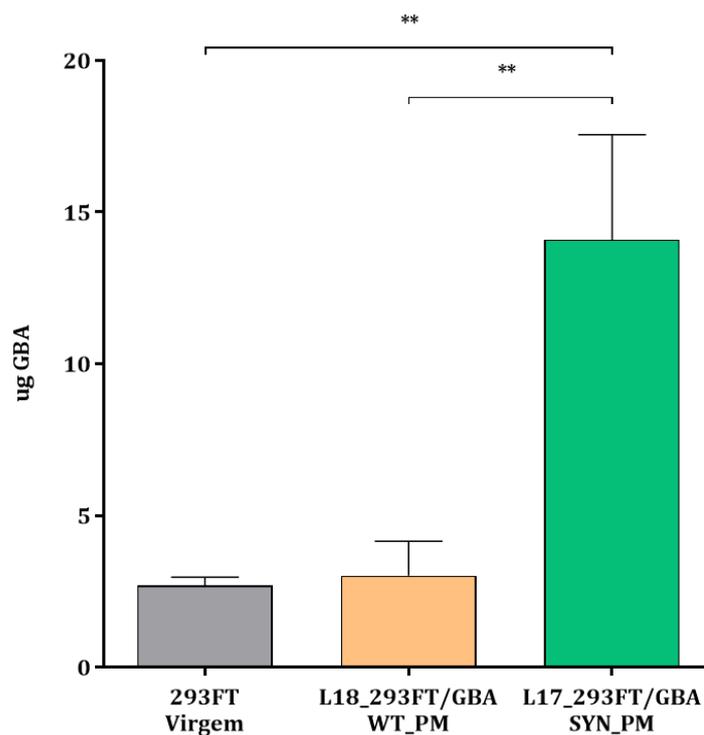
**Figura 33.** Número de células por cultura celular. O crescimento da população mista foi cerca de 1,8 vezes maior comparado com o clone 4 ( $p = 0,03$ ). Em relação ao clone 9, o mesmo mostrou um crescimento celular cerca de 1,6 vezes maior comparado ao clone 4 ( $p = 0,04$ ).

Em seguida, passamos para as análises de quantificação da GCase no sobrenadante celular dos clones 15 e 16 da L17. Pudemos observar que a produção de GCase foi da ordem de  $60,15\mu\text{g} (\pm 8,294)$  e  $53,23\mu\text{g} (\pm 11,28)$ , respectivamente. A quantificação da GCase no sobrenadante do clone 15 foi 1,6 vezes maior em relação ao produzido no sobrenadante da população mista L17 ( $p = 0,0877$ ) e 1,13 vezes mais em comparação com o produzido pelo clone 16 ( $p = 0,6402$ ). Quando comparada a quantificação da GCase no sobrenadante da L17 em comparação com o clone 16, o clone obteve um resultado cerca de 1,4 vezes maior do que o obtido pela população mista ( $p = 0,3086$ ), (Figura 34).



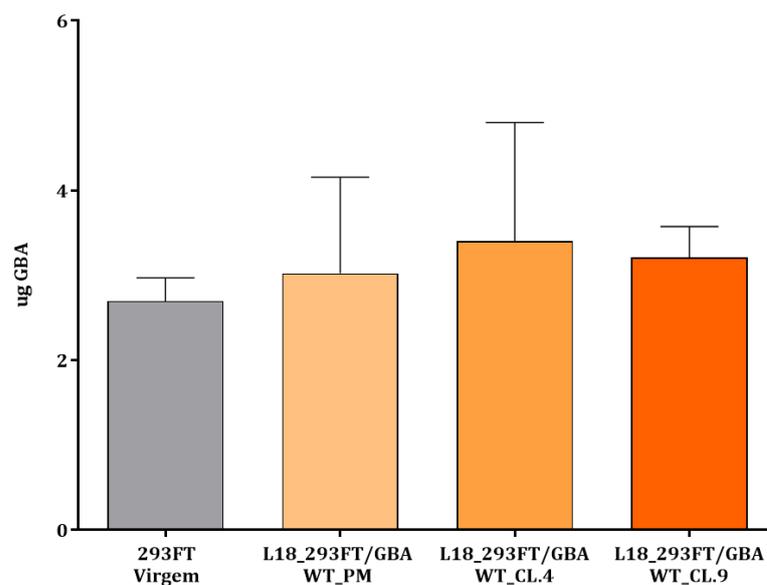
**Figura 34.** Concentração de GCase a partir de 100 $\mu$ g de proteína total presente no sobrenadante da população mista da linhagem 17 e dos clones 15 e 16. O clone 15 produziu 1,6 vezes mais que a população mista e 1,13 vezes mais que o clone 16. O clone 16 obteve 1,4 vezes mais GCase no sobrenadante em comparação com o obtido pela população mista.

Os resultados de quantificação da GCase no lisado celular, pela técnica de espectrometria de massa, mostrou a quantificação da GCase intracelular da população mista da L18 da ordem 3,02 ( $\pm$  0,57)  $\mu$ g de GCase e cerca de 14,08 ( $\pm$  1,73)  $\mu$ g no lisado da linhagem L17. A linhagem virgem obteve uma quantificação de GCase intracelular da ordem de 2,69 ( $\pm$  0,14)  $\mu$ g. Em uma análise comparativa observamos que a L18 produziu 1,12 vezes mais GCase que a linhagem virgem ( $p = 0,61$ ) e a L17 cerca de 5,2 vezes mais que a virgem ( $p = 0,007$ ), o que foi estatisticamente significativo. A produção de GCase intracelular da L17 em comparação com a L18 foi cerca de 4,7 vezes maior ( $p = 0,005$ ) (Figura 35).



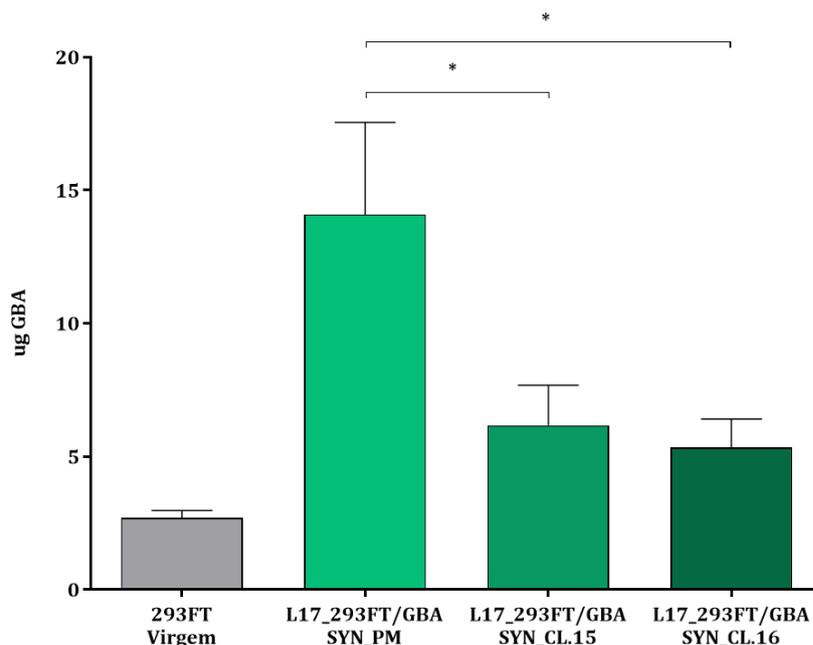
**Figura 35.** Concentração de GCase presente no lisado celular da linhagem 293FT/Virgem e das populações mistas L18 e L17 a partir de 100 $\mu$ g de proteína total. A linhagem 17 produziu 5,2 vezes mais que a virgem e 4,7 vezes mais GCase que a L18. A L18 em comparação com a virgem produziu 1,12 vezes mais GCase no lisado celular.

Os resultados de quantificação da GCase intracelular dos clones 4 e 9 da L18 foi da ordem de 3,4 $\mu$ g ( $\pm$  0,8) e 3,21 $\mu$ g ( $\pm$  0,18), respectivamente. A quantificação da GCase intracelular dos mesmos clones (4 e 9, respectivamente) foi 1,26 ( $p = 0,72$ ) e 1,01 ( $p = 0,77$ ) vezes maior em relação a população mista L18. Também não houve diferença significativa na quantificação de GCase intracelular entre os clones ( $p = 0,84$ ), como pode ser observado na Figura 36.



**Figura 36.** Concentração de GCCase presente no lisado celular da linhagem 293FT/Virgem, da população mista L18 e seus respectivos clones a partir de 100 $\mu$ g de proteína total. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a produção de GCCase intracelular.

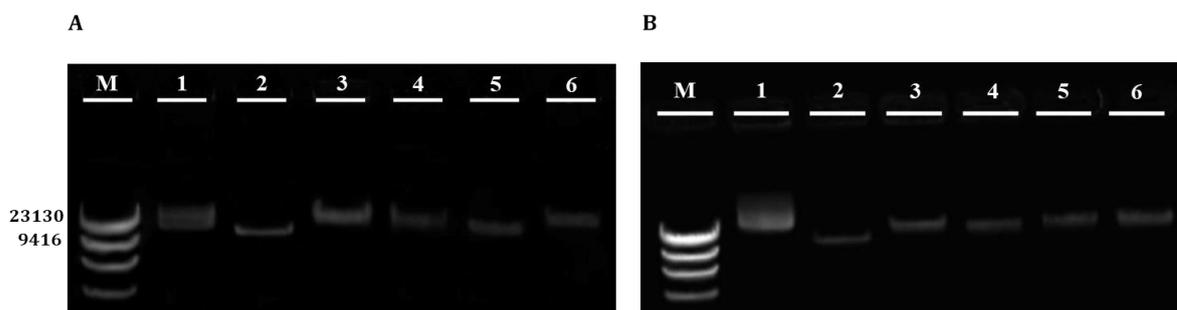
Os resultados de quantificação da GCCase intracelular dos clones 15 e 16 da L17 foi da ordem de 6,17 $\mu$ g ( $\pm$  0,76) e 5,34 $\mu$ g ( $\pm$  0,53), respectivamente. Esse resultado foi estatisticamente significativo em relação à população mista da L17, sendo que o clone 15 apresentou 2,3 mais GCCase ( $p = 0,013$ ) e o clone 16 cerca de 2 vezes mais GCCase ( $p = 0,011$ ) em relação a população mista da L17. Entre os clones não houve diferença significativa ( $p = 0,48$ ), como pode ser observado na Figura 37.



**Figura 37.** Concentração de GCCase presente no lisado celular da linhagem 293FT/Virgem, da população mista L17 e seus respectivos clones, a partir de 100 $\mu$ g de proteína total. Houve diferença estatisticamente significativa entre a produção de GCCase intracelular da população mista em comparação com os clones, tendo sido 2,3 e 2 vezes mais produtivos os clones 15 e 16, respectivamente.

### 6.5 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS INTEGRADAS DA SEQUÊNCIA DO cDNA DA *GBA* SELVAGEM E OTIMIZADA PELA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

O baixo nível de produção da enzima GCCase recombinante humana pela linhagem celular L18\_293FT\_GBA\_WT e o elevado nível de produção da enzima GCCase recombinante pela linhagem celular L17\_293FT\_GBA\_SYN levou-nos a investigar se essa diferença poderia ser explicada por diferenças no número de cópias integradas do cDNA recombinante. Para tanto, realizamos dois ensaios e os resultados foram divergentes. Em ambos os ensaios a quantificação absoluta do número de cópias lentivirais por uma única célula foi calculado pela normalização do número de cópias da sequência WPRE. A sequência WPRE está presente na construção lentiviral e o número de cópias foi determinado em relação a cópias do gene endógeno albumina. Para a realização dessa análise os pares de *primers* foram previamente testados, o DNA plasmidial foi extraído e digerido para a construção da curva referência da sequência WPRE e o DNA genômico da linhagem virgem foi utilizado de amostra referência para a curva do gene endógeno. Foram extraídos o DNA<sub>g</sub> das populações mistas e dos clones com níveis mais elevados de atividade biológica das linhagens L17 e L18 geradas, a fim de determinar o número de cópias integradas do gene da *GBA*. A verificação do DNA das amostras pode ser observada na Figura 38.



**Figura 38.** DNA para cálculo do número de cópias. (A) (M) Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III; (1) DNA plasmidial LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_P<sup>+</sup>; (2) DNA plasmidial LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_P<sup>+</sup> digerido e purificado; (3) DNAg da linhagem 293FT/Virgem; (4) DNAg da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_PM; (5) DNAg da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_CL.4; (6) DNAg da linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT\_CL.9; (B) (M) Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III; (1) DNA plasmidial LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup>; (2) DNA plasmidial LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup> digerido e purificado; (3) DNAg da linhagem 293FT/Virgem; (4) DNAg da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM; (5) DNAg da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_CL.15; (6) DNAg da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_CL.16.

O número de cópias integradas foi calculado pelo “*quantity*” obtido com base nas curvas de referência geradas pela sequência WPRE e o gene da albumina. No primeiro ensaio (Tabela 17) foram realizadas duas reações separadas. Em cada reação o número de cópias absoluto foi calculado pelo valor do *quantity* da sequência WPRE dividido pelo *quantity* do endógeno (albumina). No segundo ensaio (Tabela 18) todas as amostras foram aplicadas em uma única placa e o valor do *quantity* da sequência WPRE foi dividido pelo *quantity* do endógeno (albumina). Porém nesse ensaio não adicionamos o DNA genômico da linhagem celular virgem (controle negativo). Em ambos os casos foi previamente corrigido pelo número de cópias do mesmo no genoma, dado que a albumina é gene diploide e a sequência WPRE está presente em cópia única na construção plasmidial.

**Tabela 17.** Cálculo do número de cópias integradas do gene da *GBA* com base nas curvas referência para o gene endógeno albumina e para a sequência de cópia única WPRE presente nas construções lentivirais.

<b>Amostra</b>	<b>Quantity Albumina</b>	<b>Quantity WPRE</b>	<b>Nº de Cópias Integradas</b>
<b>L18_293FT_GBA_WT_PM</b>	4333,67	2981,72	<b>1,8 (2)</b>
	4480,57	3571,83	
	4443,69	5407,27	
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.4</b>	2809,07	2737,06	<b>1,1 (1)</b>
	2746,65	1485,88	
	2639,78	1354,40	
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.9</b>	7259,59	4148,79	<b>0,25</b>
	6421,63	4394,26	
	6220,37	2410,25	
<b>293FT_Virgem</b>	6839,33	29,23	<b>0,009</b>
	6291,44	34,41	
	5551,45	29,37	
<b>L17_293FT_GBA_SYN_PM</b>	3897,55	21776,95	<b>10,24 (10)</b>
	4120,48	21017,95	
	3819,80	17845,57	
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.15</b>	16545,15	177900,89	<b>19,32 (19)</b>
	17358,62	173278,06	
	19843,38	168100,15	
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.16</b>	11299,51	89714,61	<b>14,88 (15)</b>
	11745,16	81352,14	
	10966,68	82123,86	
<b>293FT_Virgem</b>	6429,95	183,12	<b>0,007</b>
	5969,18	184,13	
	2637,86	159,38	

**Tabela 18.** Cálculo do número de cópias integradas do gene da *GBA* com base nas curvas referência para o gene endógeno albumina e para a sequência de cópia única WPRE presente nas construções lentivirais.

<b>Amostra</b>	<b>Quantity Albumina</b>	<b>Quantity WPRE</b>	<b>Nº de Cópias Integradas</b>
<b>L18_293FT_GBA_WT_PM</b>	20936,91	22848,17	<b>1,93 (2)</b>
	21125,55	21146,70	
	19082,96	15142,62	
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.4</b>	12303,04	10457,43	<b>1,61 (2)</b>
	11941,19	8668,98	
	9976,26	8476,01	
<b>L18_293FT_GBA_WT_CL.9</b>	13511,42	6539,42	<b>1,04 (1)</b>
	15395,43	6297,88	
	13267,42	9022,12	
<b>L17_293FT_GBA_SYN_PM</b>	8066,79	7023,38	<b>1,99 (2)</b>
	8617,81	8354,77	
	9314,63	10530,36	
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.15</b>	11302,98	11897,35	<b>2,26 (2)</b>
	9524,13	12357,19	
	10772,02	11423,25	
<b>L17_293FT_GBA_SYN_CL.16</b>	12971,79	14737,87	<b>1,86 (2)</b>
	13907,66	11241,66	
	13475,95	11506,51	

Porém, não podemos afirmar até o momento o número de cópias do cDNA relativo a *GBA* recombinante nas linhagens celulares L18\_293\_FT\_GBA\_WT\_PM e L17\_293\_FT\_GBA\_SYN\_PM devido a problemas na padronização da técnica e marcação positiva na reação controle negativo (NTC) em ambos ensaios. Desta maneira, iremos realizar novos ensaios com novos oligonucleotídeos recém adquiridos no laboratório.

## 7 DISCUSSÃO

Inicialmente foram geradas quatro linhagens celulares humana, com produção transiente da enzima *GBA* humana e uma célula controle transfectada com o vetor vazio. Essas linhagens foram denominadas por: 293FT/CMV\_GBA\_WT; 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT; 293FT/CMV\_GBA\_SYN; 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN; 293FT/MOCK. Os resultados de atividade biológica por ensaio fluorimétrico, mostraram que as linhagens geradas foram capazes de secretar níveis mais elevados da GCase no sobrenadante celular, em comparação com a linhagem transfectada com o vetor vazio, e a mesma mostrou-se ser biologicamente ativa. As linhagens transfectadas com o plasmídeo portador do cDNA da *GBA* otimizada, sob o controle do promotor HeF1 $\alpha$  apresentou níveis de atividade da GCase da ordem de 133,19 U/mL ( $\pm$  26,17) o que foi 5,2 vezes mais elevado em comparação com a mesma sequência sob o controle do promotor CMV e 48 vezes mais elevado os níveis de atividade em comparação com a sequência original sob o controle do mesmo promotor. As primeiras tentativas de expressar proteínas recombinantes foram com promotores virais, como é o caso do SV40 ou do CMV (citomegalovírus) (Paborsky et al., 1990; Geisse et al., 1996), o fator de alongação humano (HeF1 $\alpha$ ) está recebendo atenção, uma vez que está sendo mais eficaz que parte dos promotores virais.

Wang e colaboradores (2008) compararam as atividades transcricionais dos promotores constitutivos: fator de alongamento1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), fosfoglicerato quinase-1 (PGK) e citomegalovírus (CMV), durante a diferenciação e propagação de células embrionárias de rato, utilizando linhagens estáveis com expressão aumentada da proteína fluorescente verde (EGFP) sob cada um destes promotores. A expressão de GFP sob o controle do promotor EF1 $\alpha$  foi a mais estável em células embrionárias indiferenciadas seguida do promotor PGK e, além disso, em células diferenciadas, a intensidade de sinal fluorescente foi maior para EF1 $\alpha$  seguido de PGK. Em células diferenciadas, o promotor CMV produziu sinal fluorescente de baixa intensidade em cerca de 60-80% das células e de intensidade como a do promotor EF1 $\alpha$  no restante das células analisadas.

Um outro estudo comparou quantitativamente a atividade de cinco promotores constitutivos comumente utilizados, sendo eles: promotor da  $\beta$ -actina humana (ACTB), citomegalovírus (CMV), fator de alongação 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), fosfoglicerato quinase (PGK) e ubiquitina C (UbC), em células embrionárias humanas, por meio do sistema lentiviral, com o intuito de assegurar a integração estável das construções promotor-eGFP no genoma dessas células. As atividades dos promotores foram comparadas em termos tanto de células

indiferenciadas quanto de células diferenciadas, e observou-se que o promotor EF1 $\alpha$  apresentou-se mais estável durante o processo de diferenciação (Norrman et al., 2010).

Um estudo posterior, de Tavares e colaboradores (2016) utilizando adenovírus, produziu um vetor recombinante portador do cDNA da *GBA* humana e do GFP, como gene repórter, ambos sob o controle do promotor CMV independentes, em células HEK-293 e, obteve-se um título viral de  $2,5 \times 10^9$  partículas/mL. Para verificar a capacidade de células epiteliais mamárias produzirem GCase através de transdução adenoviral *in vitro*, células MAC-T bovinas foram infectadas com o vetor viral, com MOI = 25. Após 24h foi observada alta expressão de GFP e 72h após a transdução foi detectada GCase no sobrenadante celular de três tamanhos distintos 61,1; 65,1 e 68,8kDa, o que acreditam ser devido a diferentes padrões de glicosilação.

Foi realizada também a transdução *in vivo*, pelo ducto mamário da cabra, com  $1 \times 10^9$  partículas virais/mL e, as proteínas totais foram medidas diariamente. Foi quantificada uma forma ativa da *GBA* presente no leite, pelo método fluorimétrico, tendo tido altos níveis de produção no segundo dia pós-infecção (111,1 mg/mL), o que representou um aumento de até 173 vezes na atividade da GCase comparado aos níveis basais. Entretanto, a partir do sexto dia após a transdução, a enzima foi quase indetectável (Tavares et al., 2016). No caso do uso do sistema lentiviral, tem-se a vantagem de apresentar expressão estável, além de que os LVs são conhecidos pela capacidade de integra-se preferencialmente próximo às regiões de eucromatina, o que aumenta a probabilidade da expressão do transgene após sua integração (Spencer et al., 2011).

Os dados obtidos de quantificação da *GBA* das linhagens transientes, por espectrometria de massa, nos mostraram que ambas as linhagens, portadora da sequência selvagem e otimizada, sob o controle do promotor HeF1 $\alpha$ , apresentaram cerca de 3,7 e 3 $\mu$ g de *GBA* a partir de 100 $\mu$ g de proteína total. Esses resultados foram obtidos em sistemas de pequena escala, porém quando expandido para sistemas de larga escala, os níveis de GCase obtidos também podem ser expandidos.

Os resultados apresentados após transfecção, mostraram que as construções plasmidiais previamente geradas são funcionais e que a sequência otimizada obteve níveis de atividade mais elevado no sobrenadante celular em comparação com a sequência original, o que nos conduziu a hipótese de que a geração de linhagens com produção permanente por meio do sistema lentiviral, em conjunto com a otimização da sequência alvo, é uma alternativa para obtenção de níveis mais elevados de atividade da GCase. Buscando alcançar esse objetivo foram realizadas transfecções com os vetores lentivirais portadores do cDNA da *GBA* selvagem e otimizada, ambos sob o controle do promotor HeF1 $\alpha$ , em linhagem celular humana HEK293FT. Os

resultados mostraram que os vetores foram capazes de formar partículas lentivirais, e os títulos virais foram obtidos a partir da concentração de 120mL de sobrenadante celular, sendo da ordem de  $5,24 \times 10^8$  e  $7,88 \times 10^8$  partículas virais/mL, respectivamente. De acordo com Tiscornia, Singer e Verma (2006), após concentração do sobrenadante celular é esperado um título de  $10^9$  a  $10^{10}$  partículas virais/mL, entretanto, as condições de produção viral bem como o tamanho dos vetores são fatores que devem ser considerados para esse tipo de comparação, bem como a sensibilidade da técnica empregada e o método utilizado para concentração das partículas lentivirais.

O uso de vetores lentivirais recebeu um aumento significativo em terapia gênica para o tratamento de doenças genéticas e adquiridas (Merten, Hebben e Bonovolenta, 2016), e está sendo o vetor de escolha para estudos de terapia gênica tanto *in vitro* como *in vivo* (Amado e Chen, 1999). Outra escolha a ser considerada é o sistema de expressão. A linhagem de células HEK293 tem sido utilizada como ferramenta de expressão de proteínas recombinantes há mais de 25 anos, e apresenta maquinaria bioquímica capaz de realizar a maior parte do processo de dobramento e processamento pós-translacional necessário para a geração de proteínas funcionais (Thomas e Smart, 2005). A linhagem HEK293T é preferida em relação à HEK293, para ensaios de transfecção, devido à presença do antígeno SV40 T tornar a linhagem mais eficiente para a produção de vetores (Merten, Hebben e Bonovolenta, 2016). O antígeno do vírus símio 40 (SV40) desempenha um papel essencial na replicação viral em células de mamíferos (Wang, Álvarez-Cabrera e Chen, 2017), o que permite taxas maiores de produção de vetores em comparação com as linhagens que não expressam essa enzima (Gama-Norton et al., 2011).

Após o cálculo dos títulos virais referente aos vetores plasmidiais pLV\_B4B2\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT\_UbC\_Puro e pLV\_B4B2\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_Mut\_UbC\_Puro foram geradas duas linhagens por meio do sistema lentiviral. Para cada linhagem foram realizados seis ciclos de transdução com MOI entre 30-60. A multiplicidade de infecção (MOI) é um parâmetro utilizado para prever a infecção viral em uma população de células-alvo (Zhang et al., 2004). Em terapia gênica, uma vez que os vetores virais são usados para transferência gênica, o MOI foi adotado como sendo o número de unidades infecciosas para o número de células disponíveis para transdução (Andreadis et al., 2000), ou seja, o número de partículas virais por célula. A eficiência da transferência gênica atinge um platô e após alcançar esse patamar, o uso de MOI mais elevados pode reduzir o número de células transduzidas (Arai et al., 1999). De acordo com Zhang e colaboradores (2004) geralmente um MOI alto é necessário para a obtenção de níveis satisfatórios de transferência gênica, entretanto, o que é possível

observar na prática é que a eficiência de transdução é menor comparado ao esperado. Neste estudo, foi verificada a expressão do gene GFP, e a eficiência de transdução ocorreu em 67,4% das células FRL-19 (linhagem celular de carcinoma hepático de feto de rato); 33,1% das células 293T, 23,1% em células NIH 3T3 (linhagem de fibroblastos embrionários murinos) e 8,7% em células 293, a um MOI de 32, pelo método de FACS.

Em um trabalho onde foi avaliada a transferência de genes no tecido córneo humano, *in vitro*, por meio de vetor lentiviral recombinante, contendo o gene GFP, foi observado que os ceratócitos humanos *in vitro*, foram transduzidos com alta eficiência, tendo sido observado por FACS, que 92% das células foram transduzidas a um MOI de 1000 e, além disso, o número de células positivas para GFP permaneceu inalterado durante os 60 dias que essas células permaneceram em cultura, o que indica expressão estável (Wang et al., 2000).

Os dados de atividade biológica da GCase no sobrenadante celular das populações mistas L17 e L18 mostraram atividade da ordem de 104,8 ( $\pm 26,35$ ) U/mL e de 2,718 ( $\pm 0,438$ ) U/mL, respectivamente, o que significa que a linhagem L17 obteve níveis de atividade cerca de 38,6 vezes mais elevado no sobrenadante em relação a L18 ( $p = 0,0305$ ), sob as mesmas condições de cultivo.

Em comparação com a linhagem virgem a população mista L17 obteve níveis de atividade da GCase da ordem de 47 e 62 maior em relação à virgem após tratamento com 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina, respectivamente, quando cultivadas em meio com 10% SBF. Em cultivo na ausência de SBF os níveis de atividade da L17 foram 3,65 e 15,8 vezes maior em relação à virgem após tratamento com 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina. Esses resultados nos mostram que a nossa linhagem contendo a sequência otimizada está produzindo *GBA* em níveis promissores. A expressão de *GBA* humana otimizada já foi testada em outros sistemas de expressão, como por exemplo, em *Pichia pastoris*. Sinclair e Choy (2002) fundiram fragmentos de cDNA da *GBA* com fragmentos da luciferase, que serviu de gene repórter. A fim de verificar a expressão de *GBA*, foi realizada a otimização de códons referente a 186 pb do gene da *GBA* de acordo com o conjunto de códons preferenciais de *P. pastoris*. O resultado obtido mostrou que enquanto a expressão de *GBA* a partir da sequência original limitava a expressão da luciferase aos níveis basais, a construção otimizada possibilitou um aumento na expressão da luciferase em 10,6 vezes mais, o que contribuiu para a expressão heteróloga da *GBA*.

Sabe-se que a produção heteróloga da *GBA* humana já foi avaliada em diversos sistemas de expressão. Cramer e colaboradores (1996) foi o primeiro grupo a relatar a produção estável de uma enzima lisossômica humana em plantas transgênicas. E apesar de apresentar diferentes modificações pós-transcricionais em relação a células de mamíferos, a proteína de 69kDa

identificada no extrato de plantas transgênicas de tabaco, mostrou-se ser biologicamente ativa, indicando que uma porção significativa do produto gênico é glicosilado e dobrado corretamente. Os autores ainda destacam que essa produção representou cerca de 10% de proteína solúvel a partir do extrato bruto qual método e, ressalta que uma planta de tabaco é capaz de produzir enzima suficiente para uma dose terapêutica padrão de *GBA*. Ainda, os autores defendem que esse é um sistema de fácil cultivo, livre de contaminação por patógenos humanos e de custo significativamente baixo.

Liu e colaboradores (1998) geraram um vetor retroviral contendo a sequência de cDNA da *GBA* humana e, transduziram a linhagem de mioblasto murino (C2C12) como também de mioblasto humano, a fim de verificar a atividade de GCCase intracelular e extracelular. As linhagens de mioblasto murino e humano apresentaram eficiência de 100% de células transduzidas com o vetor retroviral e, foram observadas de cinco a dez cópias do gene da *GBA* humana por célula transduzida com MOI entre 5 e 10. A atividade intracelular dessas linhagens após a transdução foi de cinco a dez vezes maior em relação aos controles não-transduzidos, enquanto que a atividade da GCCase secretada foi observada *in vitro*, pelas linhagens de mioblastos transduzidos por até 35 semanas.

A atividade biológica extracelular de GCCase em mioblastos humanos transduzidos foi cerca de 50U/mL, cerca de 50 vezes mais que o controle (linhagem não-transduzida) (Liu et al., 1998). Os nossos resultados mostraram níveis de atividade da GCCase 46,8 vezes mais elevados no sobrenadante da população mista da L17 em relação a virgem. Já a atividade dos clones mais promissores da L17, apresentaram atividade da GCCase no sobrenadante celular da ordem de 585,4 U/mL (clone 15) e 683,9 U/mL (clone 16).

A fim de verificar a expressão de *GBA* humana em células Sf9 (tecido de pupa de *Spodoptera frugiperda*), Martin e colaboradores (1988) infectaram células Sf9 com baculovírus recombinante que continha a sequência de cDNA da *GBA* humana. Foi verificado que a *GBA* recombinante é ativa, foi glicosilada e apresentava oligossacarídeos com elevados níveis de manose, como consequência do processamento pós-traducional. O meio de cultura foi coletado 72h após a infecção, e de  $1,2 \times 10^8$  células Sf9 infectadas com o baculovírus recombinante. Os 200mL do meio de cultura, bem como o lisado celular, resultaram em 270.000 e 400.000 unidades de atividade da GCCase, respectivamente. Porém, nesse estudo os ensaios de atividade biológica utilizaram o substrato marcado com radioisótopo  $^{14}\text{C}$ , o que torna difícil comparar com a metodologia utilizada em nosso estudo por meio do ensaio fluorimétrico. Após a purificação por cromatografia hidrofóbica, cerca de 15 a 40% desta atividade inicial foi recuperada.

Foi realizado o escalonamento da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM com produção estável da GCase, em garrafas de 10 andares e avaliamos o sobrenadante celular 72h após trocar o meio de cultura por meio fresco sem adição de SBF. Nós verificamos que foi possível realizar a expansão celular e escalonar os níveis de atividade da GCase. Foram coletados 500mL de sobrenadante e obtidas 201.931 unidades de *GBA* no sobrenadante da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM em um sistema onde havia  $6,06 \times 10^8$  células. Esses resultados foram promissores e a população mista da L17 obteve níveis de atividade cerca de 963 vezes maior em comparação com o cultivo da mesma linhagem celular em cultivo em pequena escala (2mL).

A prática da geração de linhagens celulares transgênicas requer diversos controles, entre eles a obtenção de clones celulares, uma vez que é conhecido o efeito do sítio de integração no genoma e a taxa de transcrição do gene alvo. As linhagens celulares de mamíferos, tais como, CHO (ovário de *hamster* chinês), NS0 (linhagem celular de mieloma derivada de linfócitos B murinos), Sp2/0 (linhagem celular de mieloma linfoblastóide derivada de um hibridoma de linfócitos B murinos), BHK (rim de *hamster*) e HEK (rim de embrião humano) são os sistemas preferidos para a produção de proteínas recombinantes, dado que mostraram propriedades favoráveis para a produção de biofármacos funcionais e bioativos (Wurm, 2004). A linhagem HEK-293 é comumente utilizada devido à alta suscetibilidade a transfecção, e a obtenção de altos níveis de expressão transiente (Backliwal et al., 2008). Já a expressão estável por meio de vetores virais também está sendo relatada (Kim et al., 2009). Song e colaboradores (2011) selecionaram 55 clones a partir de 5% de células fluorescentes provenientes da população heterogênea, utilizando a linhagem HEK-293. Os clones isolados mais produtivos obtiveram níveis de produção de 5 a 7 vezes mais em relação à população heterogênea, e foi possível escalonar a produção de anticorpo para sistemas de 25 litros. Esse sistema mostrou-se eficiente para a produção de biofármacos em quantidades consideráveis, o que pode vir a ser utilizado para o desenvolvimento de testes pré-clínicos.

Após clonagem a partir de célula única, realizada neste trabalho, o nível de atividade foi cerca de 5,6 vezes maior no sobrenadante do clone 15 em comparação à população mista e 6,5 vezes maior no sobrenadante do clone 16 comparado à população mista. Le Ru e colaboradores (2010) demonstraram ser possível replicar eficientemente o vírus da gripe em linhagem HEK-293 em suspensão, na ausência de SBF, e obter resultados promissores. Após a otimização das condições de infecção, foram obtidos títulos virais de até  $10^9$  partículas virais infectantes/mL em biorreatores de 3 litros. Sistemas de expressão em linhagens humanas, como a realizada neste trabalho, apresenta a capacidade de produzir proteínas mais semelhantes às sintetizadas

naturalmente em humanos, o que pode ser considerado vantajoso em relação aos demais sistemas de mamíferos (Ghaderi et al., 2010).

Kim e colaboradores (2004) realizaram a transdução em três diferentes linhagens: HeLa, SH-SY5Y e HEK 293 (MOI entre 10-50) com vetor lentiviral recombinante contendo a sequência de cDNA que codifica para *GBA*, e mediram os níveis de atividade da GCase cinco dias após a transdução. Foi realizada a transdução com vetores lentivirais os quais a sequência da *GBA* estava sob o controle do promotor CMV e HeF1 $\alpha$ , e os níveis mais elevados de atividade foram obtidos nas linhagens transduzidas com os vetores lentivirais em que a sequência alvo estava sob o controle do promotor HeF1 $\alpha$ . Em média os níveis de atividade biológica da GCase no sobrenadante foram de 189 U de GBA/mL, cerca de 2,4 vezes mais que a média das linhagens não transduzidas (80 U de GBA/mL).

Os experimentos foram realizados em meio de cultivo contendo 10% de SBF e visando inibir a GCase endógena, as células foram ressuspensas e incubadas com 1mM de epóxido de conduritol (CBE) (Kim et al., 2004). No presente estudo nós obtivemos níveis consideráveis de atividade da GCase a partir da transdução com o vetor lentiviral portador do cDNA da *GBA* otimizada. Os níveis de GCase no sobrenadante da população mista da L17, em cultivo com 10% SBF, foram da ordem de 329,7 U/mL (tratada com 1 $\mu$ g de puromicina) e de 439,5 U/mL (tratada com 5 $\mu$ g de puromicina). Se levarmos em consideração que a linhagem gerada não é nocaute para o gene da *GBA* e que não tratamos previamente com o inibidor CBE, descontando os nossos resultados obtidos para a linhagem virgem (7,04 U/mL), temos ainda níveis de atividade da GCase de 322,7 e 432,5 U/mL, respectivamente. Levando em consideração que o meio de cultivo foi trocado 48h antes da coleta, nosso sistema mostrou ser eficiente para a produção de enzimas recombinantes, com expressão estável, tendo em vista que produzimos o dobro do que a média obtida por Kim e colaboradores (2004).

Entretanto, considerando a nossa linhagem transduzida com o vetor lentiviral portador da sequência de cDNA da *GBA* selvagem, os níveis de atividade biológica da GCase obtidos no sobrenadante celular mesmo após a seleção clonal, ficou abaixo do encontrado pelo grupo de Kim e colaboradores (2004), o que ainda iremos investigar. LVs são eficazes para a transferência de genes, porém o número de cópias de DNA proviral integradas pode variar consideravelmente. Uma estratégia utilizada para garantir como também para aumentar o número de cópias integradas é o número de ciclos de transdução (Charrier et al., 2011). Em um estudo com células T, o número de cópias integradas foi avaliado após transdução lentiviral com MOI de 20 sob diferentes condições, e foi obtido número de cópias entre 1 e 3 após avaliação por *qPCR* (Qasim et al., 2007). Nós ainda estamos realizando análises a fim de

verificar a relação entre os níveis de atividade biológica e o número de cópias integradas da nossa sequência alvo.

Com relação a análise comparativa da atividade biológica da enzima recombinante GCCase humana portadora dos códons originais *versus* a linhagem celular portadora dos códons sinônimos, os dados aqui apresentados permitem a realização dessa investigação com base nos dados obtidos na expressão transiente da GCCase. Conforme mencionado acima, a atividade biológica da GCCase portadora de codons sinônimos presentes no sobrenadante sob controle do promotor HeF1 $\alpha$ , 48h após a transfecção foi 48 vezes maior ( $133 \pm 26,2$  U de GBA/mL) quando comparada com a atividade biológica da GCCase portadora de codons originais ( $2,76 \pm 0,16$  U de GBA/mL). Essa diferença é significativa ( $p = 0,03$ ).

Os ensaios realizados até o momento para a caracterização da linhagem celular L18 com produção estável da GCCase com os códons originais mostraram baixos níveis de produção da mesma. Porém, informações definitivas sobre esse baixo nível da enzima recombinante requer ensaios adicionais que estão em andamento, entre eles podemos citar, determinação do número de cópias do rGBA\_WT, como mencionado acima e reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico da presença ou não do cDNA recombinante a partir do DNA genômico obtido da linhagem L18\_293FT/GBA\_WT\_PM e seus clones. Desta maneira, enquanto esses ensaios estão sendo realizados, optamos por discutir os dados obtidos neste estudo no que diz respeito a caracterização da linhagem celular L17\_293FT/GBA\_SYN\_PM e seus clones derivados.

Com relação aos dados de atividade intracelular, Kim e colaboradores (2004), já citado anteriormente, obtiveram em média, níveis de atividade da GCCase de 233 U/mg de proteína proveniente das linhagens HeLa, SH-SY5Y e HEK 293, com MOI entre 10-50. Esse resultado foi 2,1 vezes maior em comparação com a média das linhagens não transduzidas (113 U/mg). No presente estudo nós obtivemos níveis de atividade específica da GCCase de 307,5 U/mg para a população mista da L17. Subtraindo o valor obtido pela linhagem virgem temos que a atividade da GCCase pela população L17 foi de 211,9 U/mg. Esses resultados sugerem que a linhagem L17 mostrou-se promissora para a produção da enzima recombinante GCCase.

A atividade intracelular de GCCase em mioblastos humanos transduzida por Liu e colaboradores (1998), foi de 1700U/mg, o que corresponde a cerca de 4 vezes mais que o controle. Quando avaliamos a atividade específica após a clonagem, verificamos que a mesma foi efetiva dado que os níveis de atividade foram mais elevados em comparação com a população mista e com a linhagem não transduzida (linhagem controle). Os melhores clones da L17 apresentaram atividade específica de 586,3 (clone 15) e 752 (clone 16) U/mg, o que foi 6 e 8 vezes maior em comparação com a linhagem virgem.

Um trabalho realizado com expressão de *GBA* em células CHO mostrou um produto de GCCase glicosilada na forma associada a células de 64 e 59kDa, e de maneira segregada com tamanho entre 63-69kDa. Além disso, verificaram atividade específica da GCCase produzida por subclones da ordem de 28,54  $\mu\text{mol}$  4-MU/min/mg (Novo et al., 2012). Apesar das linhagens celulares provenientes de mamíferos, fornecerem a maquinaria para o dobramento correto e glicosilação necessária à produção de proteínas funcionais, como já foi dito anteriormente, o uso de linhagens humanas, ainda é um sistema considerado mais seguro.

Das enzimas comercializadas a alfavelaglicerase, produzida em células humanas, por meio de ativação gênica, foi a que apresentou menor porcentagem de imunogenicidade, variando de 0-1% (VPRIV: alfavelaglicerase. Cambridge (MA-EUA): *Shire Human Genetics Therapies Inc.*). Essa porcentagem na formação de anticorpos anti-enzima em pacientes que receberam infusão de alfataliglicerase, produzida em células de cenoura, foi de 6% (UPLYSO: alfataliglicerase. Karmiel (ISR): *Protalix Biotherapeutics*), enquanto que em pacientes que receberam a infusão de imiglucrase, produzida em células CHO, a imunogenicidade foi de 15,6% (CERAZYME: imiglucrase. Cambridge (MA-EUA): *Genzyme Corporation*).

Apesar disso, uma análise quanto aos perfis de glicosilação e funcionalidade dessas moléculas, mostrou que a diferença encontrada nos perfis de glicosilação relaciona-se a variação dos resíduos terminais e comprimento da cadeia de manose, mas que não afetam a atividade enzimática e a estabilidade da proteína gerada. Ainda, essas enzimas apresentaram captação celular e estabilidade em macrófagos de ratos e humanos de forma semelhante, e sua funcionalidade *in vivo*, mostrou que as três enzimas avaliadas, também foram captadas pelos órgãos alvo de maneira semelhante (Tekoah et al., 2013).

Pela técnica de espectrometria de massa também foi possível avaliar o quanto de *GBA* produzimos a partir da linhagem L17\_293FT/*GBA*\_SYN\_PM e após a seleção clonal. A partir de 100 $\mu\text{g}$  de proteína total foi obtido 38,4 $\mu\text{g}$  de GCCase no sobrenadante celular da população mista da linhagem L17, enquanto que no lisado dessa mesma linhagem obtivemos 14 $\mu\text{g}$  de GCCase. Para os clones provenientes da população mista da L17, as quantificações de GCCase obtida no sobrenadante celular foram de 60,15 $\mu\text{g}$  (clone 15) e 53,2 $\mu\text{g}$  (clone 16), enquanto que no lisado celular foram obtidos 6,2 $\mu\text{g}$  (clone 15) e 5,3 $\mu\text{g}$  (clone 16). A linhagem controle, ou seja, não transduzida, obteve níveis de GCCase da ordem de 0,87 $\mu\text{g}$  no sobrenadante celular e 2,7 $\mu\text{g}$  no lisado celular.

Somando as quantificações de *GBA* obtidas no sobrenadante e no lisado celular temos que a linhagem virgem produziu 3,57 $\mu\text{g}$  de GCCase. A população mista da L17 produziu 52,5 $\mu\text{g}$  de GCCase e os clones 15 e 16 produziram 66,3 e 58,6 $\mu\text{g}$  de GCCase. A partir desses dados,

verificamos que a linhagem gerada a partir do vetor lentiviral portador do cDNA da *GBA* otimizada também apresentou resultados promissores na quantificação da GCase pela técnica de espectrometria de massa. O resultado da população mista da L17 foi 14,7 vezes maior que a linhagem controle.

Se considermos que foi em sistemas de pequena escala (4mL), é possível expandir a produção de GCase em sistemas mais amplos, como o demonstrado pela linhagem L17 em garrafas de 10 andares. No caso da linhagem otimizada, tanto a população mista como os clones produziram mais de 25% de GCase, considerando a quantificação de proteína total utilizada na técnica. He e colaboradores (2012) avaliaram a atividade da GCase a partir de uma construção plasmidial contendo a sequência da *GBA*, que foi inserida em plantas de *Arabidopsis thaliana* por meio de transferência gênica mediada por *Agrobacterium*. Foram coletadas sementes provenientes de 43 plantas e realizada a extração de proteínas para posterior ensaio de atividade biológica. A linhagem transgênica com os níveis mais elevados de GCase apresentou atividade de 24,0 nmol/min/mg de proteína solúvel total.

A necessidade de produzir proteínas recombinantes aumentou à medida que novas aplicações em diversos campos comerciais se tornaram uma realidade. Novos campos de estudo e sistemas de produção têm sido utilizados a fim de gerar grandes quantidades de proteínas recombinantes por meio de uma gama crescente de organismos geneticamente modificados (Palomares, Estrada-Mondaca e Ramírez, 2004).

Estratégias para obter genes integrados cromossomicamente em células animais foram desenvolvidas, ainda assim, um problema encontrado com integração cromossômica é a possibilidade de que o gene de interesse se torne integrado em uma região inativa de cromatina (Twyman e Whitelaw, 2000), porém LVs são conhecidos por integrar-se preferencialmente próximo às regiões de eucromatina, o que aumenta a probabilidade da expressão do transgene após sua integração (Spencer et al., 2011). Inicialmente a expressão transiente é tida como uma boa opção para testes preliminares de candidatos a drogas, ou testes que visem verificar a funcionalidade dos vetores de expressão. A partir disso, a geração de linhagens com produção estável de proteínas recombinantes por meio de expressão viral, torna-se uma medida promissora (Palomares, Estrada-Mondaca e Ramírez, 2004).

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ❖ Os vetores plasmidiais são funcionais e permitiram a produção transiente da proteína recombinante GCCase com os códons originais e da enzima GCCase recombinante portadora de códons sinônimos;
- ❖ Foram geradas 4 linhagens celulares com produção transiente da proteína recombinante GCCase e entre as mesmas, a linhagem celular 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN que apresenta a molécula de *GBA* com códons sinônimos sob controle do promotor HEF1 $\alpha$  mostrou maiores níveis da enzima lisossomal GCCase da ordem de 133,19 ( $\pm$  45,32) U de GBA/mL de sobrenadante;
- ❖ Foi demonstrado também que o nível da enzima lisossomal recombinante GCCase é promotor dependente. Sob controle do promotor CMV o nível de produção de GCCase é cerca de 5 vezes inferior, da ordem de 25,61 ( $\pm$  9,35) U de GBA/mL de sobrenadante;
- ❖ Ambas enzimas lisossomais recombinantes, a GCCase portadora de códons originais e a GCCase portadora de códons sinônimos são biologicamente ativas conforme demonstrado pela análise da atividade biológica da enzima GCCase presente no sobrenadante dessas culturas por 48h em monocamada sem SBF;
- ❖ Observamos que a enzima recombinante GCCase portadora de códons sinônimos mostrou níveis da enzima secretada cerca de 48 vezes maiores que a enzima recombinante portadora de códons originais sob controle do promotor HeF1 $\alpha$ ;
- ❖ Ambos vetores lentivirais são funcionais em termos de formação de partículas lentivirais conforme demonstrado pela produção do título viral de  $5,24 \times 10^8$  pLV/mL para o vetor LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT e  $7,88 \times 10^8$  pLV/mL para o vetor LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN;
- ❖ O sistema lentiviral bicistrônico foi efetivo e permitiu a geração de duas linhagens celulares com produção estável da enzima recombinante GCCase e resistentes ao tratamento com puromicina;
- ❖ Foram geradas duas linhagens celulares com produção permanente da enzima lisossomal recombinante GCCase que mostraram diferentes níveis de produção da mesma: a linhagem celular portadora do cDNA da *GBA* com os códons originais nomeada por L18\_293FT\_GBA\_WT e a linhagem celular portadora do cDNA da *GBA* com códons sinônimos nomeada por L17\_293FT\_GBA\_SYN;
- ❖ A linhagem celular L18\_293FT\_GBA\_WT apresentou uma baixa produção da enzima recombinante, da ordem de 2,71 ( $\pm$  0,4) U GBA/mL no sobrenadante da cultura,

enquanto a célula virgem apresentou uma produção média da enzima endógena de 4,94 ( $\pm 1,17$ ) U GBA/mL no cultivo por 48h em monocamada sem SBF ( $p < 0,05$ );

- ❖ A atividade específica da enzima recombinante produzida pela linhagem L18\_293FT\_GBA\_WT foi da ordem de 108,4 ( $\pm 13,04$ ) U GBA/mg de proteína total similar ao observado pela célula virgem da ordem de 95,58 ( $\pm 8,25$ ) U GBA/mg de proteína total ( $p > 0,05$ );
- ❖ A linhagem celular L17\_293FT\_GBA\_SYN apresentou uma alta produção da enzima recombinante, da ordem de 254,1 ( $\pm 7,2$ ) U GBA/mL no sobrenadante da cultura, cerca de 51 vezes maior que a produção endógena de GBA pela célula virgem no cultivo por 48h em monocamada sem SBF ( $p < 0,05$ );
- ❖ A produtividade da linhagem celular L17\_293FT\_GBA\_SYN quanto o nível da enzima lisossomal secretada é 236,6 ( $\pm 7,2$ ) U/  $10^6$  células, cerca de 121 vezes maior da célula 293FT virgem (1,96 ( $\pm 0,1$ ) U GBA/  $10^6$  células) quando cultivadas por 48h em monocamada em meio de cultura sem SBF. Essa diferença é significativa ( $p < 0,05$ );
- ❖ A atividade específica da enzima recombinante produzida pela linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN foi da ordem de 307,5 ( $\pm 26,74$ ) U GBA/mg de proteína total cerca de 3 vezes maior ao observado pela célula virgem. Essa diferença é significativa ( $p < 0,05$ );
- ❖ A produtividade da linhagem L17\_293FT\_GBA\_SYN quanto o nível de *GBA* intracelular é 159,3 ( $\pm 22,48$ ) U GBA/ $10^6$  células, cerca de 2,64 vezes maior que os níveis da enzima lisossomal intracelular da célula virgem (60,19 ( $\pm 9,67$ ) U GBA/ $10^6$  células). Essa diferença é significativa ( $p < 0,05$ );
- ❖ Foi possível a seleção clonal da população celular L17\_293FT\_GBA\_SYN com produção permanente da *GBA*. A análise de 11 clones mostrou que 46% dos clones secretam baixos níveis de *GBA*, inferiores aos níveis da população mista (entre 89 U de GBA/mL e 230 U de GBA/mL), 27% secretam níveis intermediários de *GBA* (entre 265 U de GBA/mL e 301 U de GBA/mL) e 27% secretam níveis elevados de *GBA* (entre 441 U de GBA/mL e 683 U de GBA/mL);
- ❖ Os clones mais produtivos derivados da linhagem celular L17\_293FT\_GBA\_SYN nomeados por L17\_293FT\_GBA\_SYN\_clone 15 e L17\_293FT\_GBA\_SYN\_clone 16. A produtividade do clone 15 quanto o nível de *GBA* intracelular foi cerca de 2 vezes superior, da ordem de 313,4 ( $\pm 13,38$ ) U GBA/ $10^6$  células, à população mista. A produtividade do clone 16 foi similar, da ordem de 293,3 ( $\pm 4,9$ ) U GBA/ $10^6$  células;
- ❖ Foi possível quantificar a quantidade da enzima lisossomal recombinante em todas

populações celulares geradas nesse trabalho, tanto as linhagens celulares com produção transiente de *GBA* quanto as linhagens celulares com produção estável de *GBA*.

## 9 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que os clones celulares L17\_293FT\_GBA\_SYN\_clone 15 e L17\_293FT\_GBA\_SYN\_clone 16 são capazes de produzir elevados níveis de  $\beta$ -glicosilceramidase recombinante. A enzima lisossomal produzida por esses clones celulares é biologicamente ativa *in vitro* e, portanto, podemos sugerir que esses clones celulares gerados neste trabalho apresentam potencial para produção e purificação da GCase em sistemas de larga escala, visando seu uso futuro em testes clínicos, para uso como terapia de reposição enzimática para pacientes com DG.

Os dados obtidos mostram que a agregação da engenharia genética, códons sinônimos e sistema lentiviral permitiu a geração de uma nova molécula recombinante da glicosiceramidase humana biologicamente ativa *in vitro*.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson C.S., Jones I.M. The molecular basis of HIV capsid assembly--five years of progress. **Reviews in medical virology**, 14(2):107-21, 2004.

Aflaki E, et al. Macrophage models of Gaucher disease for evaluating disease pathogenesis and candidate drugs. **Sci Transl Med.**, 6:240ra73, 2014.

Aiuti A., et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. **Science**, 341:1233151, 2013.

Amado R.G., Chen I.S. Lentiviral vectors-the promise of gene therapy within reach? **Science**, 285:674-676, 1999.

Andersson H.C., et al. Individualization of long-term enzyme replacement therapy for Gaucher disease. **Genet. Med.**, 7:105-110, 2005.

Andreadis S., et al. Morgan Toward a more accurate quantitation of the activity of recombinant retroviruses: alternatives to titer and multiplicity of infection **J. Virol.**, 74:3431-3439, 2000.

Arai T., et al. Dose-dependent transduction of vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector into human solid tumor cell lines and murine fibroblasts. **Virology**, 260:109-115, 1999.

Arava Y., et al. Dissecting eukaryotic translation and its control by ribosome density mapping. **Nucleic Acids Res.**, 33:2421-2432, 2005.

Backliwal G., et al. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1g/L by transient transfection under serum-free conditions. **Nucleic Acids Res.**, 36:e96, 2008.

Bailly-Bechet M., et al. Codon usage domains over bacterial chromosomes. **PLOS Comput. Biol.**, 2:e37, 2006.

Baris H.N., Cohen I.J., Mistry P.K. Gaucher disease: The metabolic defect, pathophysiology, phenotypes and natural history. **Pediatr Endocrinol Rev.**, 12:72-81, 2014.

Barton N.W., et al. Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency – Macrophage – targeted glucocerebrosidase for Gaucher Disease. **The New England Journal of Medicine**, 1464-1470, 1991.

Beutler E., Gelbart T. **Glucocerebrosidase (Gaucher disease)**. **Hum. Mutat.**, 8:207-213, 1996.

Beutler E., Grabowski G.A. Gaucher disease. In: Scriver, C., et al., editors. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill, p.3663-8, 2001.

Buhr F., et al. Synonymous Codons Direct Cotranslational Folding toward Different Protein Conformations. **Mol. Cell**, 61:341-51, 2016.

Bulmer M. The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage. **Genetics**, 129:897-907, 1991.

CERAZYME: imiglucerase. Cambridge (MA-EUA): **Genzyme Corporation** [bula de medicamento].

Charrier S., et al. Quantification of lentiviral vector copy numbers in individual hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction. **Gene Ther.**, 18:479-87, 2011.

Cindik N., et al. Gaucher disease with communicating hydrocephalus and cardiac involvement. **Clin. Cardiol.**, 33:E26-E30, 2010.

Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H. Retroviruses: **Cold Spring Harbor**, 1997.

Cramer C.L., et al. Radin, Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco, **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 792:62-71, 1996.

Crick F.H.C. Codon-anticodon pairing; The wobble hypothesis. **Journal of Molecular Biology**, 19(2):548-555, 1966.

Dandana A., et al. Gaucher Disease: Clinical, Biological and Therapeutic Aspects. **Pathobiology**, v.83(1), p.13-23, 2016. S. Karger AG.

de Duve C. From Cytases to Lysosomes. **Fed. Proc.**, 23:1045-1049, 1964.

Delenda C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. **J. Gene. Med.**, 6(suppl. 1):S125-S138, 2004.

Desnick R.J., Schuchman E.H. Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: Lessons from 20 years of experience and remaining challenges. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, 13:307-35, 2012.

Dinur T., et al. Human acid beta-glucosidase: isolation and amino acid sequence of a peptide containing the catalytic site. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 83:1660-1664, 1986.

Duret L. tRNA gene number and codon usage in the *C. elegans* genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes. **Trends Genet.**, 16:287-289, 2000.

Dvir H., et al. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. **EMBO Rep.**, 4:704-9, 2003.

Elstein D., et al. Disease severity in sibling pairs with type 1 Gaucher disease. **J. Inherit. Metab. Dis.**, 33:79-83, 2010.

Feng L., Niu D.K. Relationship between mRNA stability and length: an old question with a new twist. **Biochem. Genet.**, 45:131-137, 2007.

Friedman B.A., Hayes M. Enhanced in vivo uptake of glucocerebrosidase. **Patent Number:5**, 549, 892, 1993.

Fu W., et al. Human immunodeficiency virus type 1, human protein interaction database at NCBI. **Nucleic acids research**, 37:D417-22, 2009.

Gama-Norton L., et al. Lentivirus production is influenced by SV40 large T-antigen and chromosomal integration of the vector in HEK293 cells. **Hum. Gene Ther.**, 22:1269-1279, 2011.

Geisse S., et al. Eukaryotic expression systems: a comparison. **Protein Expr. Purif.**, 8(3):271-282, 1996.

Germain D.P. Gaucher's disease: a paradigm for interventional genetics. **Clin. Genet.**, 65(2):77-86, 2004.

Ghaderi D., et al. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. **Nature Biotechnology**, 28(8):863-7, 2010.

Goker-Alpan O., et al. Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers. **J. Med. Genet.**, 42:e37, 2005.

Goker-Alpan O. Therapeutic approaches to boné pathology in Gaucher disease: past, presente and future. **Mol. Genet. Metab.**, 104:438-447, 2011.

Goldim M.P., et al. Screening of high-risk Gaucher disease patients in Brazil using miniaturized dried blood spots and leukocyte techniques. **Gene**, 508(2):197-198, 2012.

Gomes, F.G.F.L.R. **Geração de vetor lentiviral sintético para terapia genética ex vivo**. 2016. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos animais domésticos e silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Grabowski G.A. Gaucher disease: Gene frequencies and genotype/phenotype correlations. **Genet. Test.**, 1:5-12, 1997.

Grabowski G.A., et al. Dose-response relationships for enzyme replacement therapy with imiglucerase/alglucerase in patients with Gaucher disease type 1. **Genet. Med.**, 11(2):92-100, 2009.

Grabowski G.A. Gaucher disease and other storage disorders. Hematol. **Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, 1:13-18, 2012.

Graham F.L., et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J. Gen. Virol.**, 36(1):59-74, 1977.

Grantham R., et al. Codon catalogue usage and the genome hypothesis. **Nuc. Acids Res.**, 8:49-62, 1980.

Guye P., et al. Rapid, modular and reliable construction of complex mammalian gene circuits. **Nucleic Acids Res.**, 41:e156, 2013.

He X. et al. Production of active human glucocerebrosidase in seeds of *Arabidopsis thaliana* complex-glycan-deficient (cgl) plants. **Glycobiology**, (22)4:492-503, 2012.

- Higgs P.G., Ran W. Coevolution of codon usage and tRNA genes leads to alternative stable states of biased codon usage. **Mol. Biol. Evol.**, 25:2279-2291, 2008.
- Horowitz M., et al. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. **Genomics**, 4:87-96, 1989.
- Hu H., et al. Codon optimization significantly improves the expression level of a keratinase gene in *P. pastoris*. **PLoS One**, 8:e58393, 2013.
- Huang W.J., Zhang X., Chen W.W. Gaucher disease: a lysosomal neurodegenerative disorder. **Eur. Ver. Med. Pharmacol. Sci.**, 19:1219-1226, 2015.
- Jmoudiak M., Futerman A.H. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. **Br. J. Haematol.**, 129:178-88, 2005.
- Katz R.A., Skalka A.M. The retroviral enzymes. **Annual review of biochemistry**, 63:133-73, 1994.
- Kim V.N., et al., Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. **Journal of virology**, 72(1):811-6, 1998.
- Kim E.Y., et al. Expression and secretion of human glucocerebrosidase mediated by recombinant lentivirus vectors in vitro and in vivo: implications for gene therapy of Gaucher disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 318:381-390, 2004.
- Kim K.S., et al. Enhancement of recombinant antibody production in HEK 293E cells by WPRE. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, 14:633-638, 2009.
- Kimchi-Sarfaty C., et al. A “Silent” Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. **Science**, 315:525-528, 2007.
- King J.L., Jukes T.H. Non-Darwinian evolution: Random fixation of selectively neutral mutations. **Science**, 164:788-798, 1969.
- Kinghorn K.J., et al. A *Drosophila* model of neuronopathic Gaucher disease demonstrates lysosomal-autophagic defects and altered mTOR signalling and is functionally rescued by rapamycin. **J. Neurosci.**, 36:11654–11670, 2016.
- Kirkegaard T. Emerging therapies and therapeutic concepts for lysosomal storage diseases. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, 1(5):385-404, 2013.
- Koprivica V., et al. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. **Am. J. Hum. Genet.**, 66:1777-1786, 2000.
- Kutner R.H., Zhang X.Y., Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. **Nature Protocols**, 4:11, 2009.
- Lachmann R. H., et al. Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher's disease. **QJM**, 97(4):199-204, 2004.

Lee S.J., et al. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. **Science**, 295(5561):1898-1901, 2002.

Le Ru A., et al. Scalable production of influenza virus in HEK-293 cells for efficient vaccine manufacturing. **Vaccine**, 28:3661-3671, 2010.

Li W.H. Models of nearly neutral mutation with particular implications for nonrandom usage of synonymous codons. **J. Mol. Evol.**, 24:337-345, 1987.

Liu C., et al. Long-term expression and secretion of human glucocerebrosidase by primary murine and human myoblasts and differentiated myotubes, **J. Mol. Med.**, 76:773-781, 1998.

Limkul J., et al. The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* plants. **Plant Biotechnology Journal**, (14)8:1682-1694, 2016.

Lusic M., Siciliano R.F. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. **Nature Reviews Microbiology**, (15)2:69-82, 2017.

Maas M., Poll L.W., Terk M.R. Imaging and quantifying skeletal involvement in Gaucher disease. **Br. J. Radiol.**, 75(suppl 1):A13-A24, 2002.

Machaczka M., et al. Substrate reduction therapy with miglustat for type 1 Gaucher disease: a retrospective analysis from a single institution. **J. Med. Sci.**, 117:28-34, 2012.

Martins A.M., et al. Recommendations on diagnosis, treatment, and monitoring for Gaucher disease. **The Journal of Pediatrics**, 155(4):S10-S18, 2009.

Martin B.M., et al. Glycosylation and processing of high levels of active human glucocerebrosidase in invertebrate cells using a baculovirus expression vector. **DNA**, 7(2):99-106, 1988.

Matsui H., et al. Ex vivo gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained in vivo factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors. **Stem Cells.**, 25(10):2660-9, 2007.

Mehta A. Epidemiology and natural history of Gaucher's disease. **Eur. J. Intern. Med.**, 17:S2-S5, 2006.

Merten O-W., Hebben M., Bovolenta C. Production of lentiviral vectors. **Molecular Therapy Methods & Clinical Development**, 3:16017, 2016.

Mignot C., et al. French Type 2 Gaucher Disease Study Group. Type 2 Gaucher disease: 15 new cases and review of the literature. **Brain Dev.**, 28:39-48, 2006.

Mikosch P., Hughes D. An overview on bone manifestations in Gaucher disease. **Wiener Med. Wochenschr.**, 160:609-624, 2010.

Mistry P.K., et al. Osteopenia in Gaucher disease develops early in life: response to imiglucerase enzyme therapy in children, adolescents and adults. **Blood Cells Mol Dis.**, 46(1):66-72, 2011.

Mistry P.K., et al. Understanding the natural history of Gaucher disease. **Am. J. Hematol.**, 90 Suppl 1, S6-11, 2015.

Montini E., et al. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. **The Journal of clinical Investigation**, 119(4):964-75, 2009.

Nabiyouni M., Prakash A., Fedorov A. Vertebrate codon bias indicates a highly GC-rich ancestral genome. **Gene**, 519:113-119, 2013.

Nackley A.G., et al. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. **Science**, 314:1930-1933, 2006.

Naldini, L., et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, 272:263-7, 1996.

Navon S., Pilpel Y. The role of codon selection in regulation of translation efficiency deduced from synthetic libraries. **Genome Biology**, 12(2):R12, 2011.

Norrman K., et al. Quantitative comparison of constitutive promoters in human ES cells. **PLoS One**, 5(8):e12413, 2010.

Novo J.B., et al. Generation of a Chinese hamster ovary cell line producing recombinant human glucocerebrosidase. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012:875383, 2012.

Orvisky E., et al. Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: Correlation with phenotype and genotype. **Mol. Genet. Metab.**, 76: 262–270, 2002.

Paborsky L.R., et al. Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen. **Protein Eng.**, 3(6):547-553, 1990.

Palomares L.A., Estrada-Mondaca S., Ramírez O.T. Production of Recombinant Proteins, in Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Applications (Ozturk, S. and Hu, W. S., eds.), **Marcel Dekker, New York, NY, in press.**, 2004.

Pastores G.M. Neuropathic Gaucher disease. **Wien. Med. Wschr.**, 160:605-608, 2010.

Plotkin J.B., Kudla G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. **Nat. Rev. Genet.**, 12:32-42, 2011.

Poletti V., Mavilio F. Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome. **Mol. Ther. Methods Clin. Dev.**, 8:31-41, 2018.

Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. **Doença de Gaucher**. Editores: Paulo Dornelles Picon, Maria Inez Pordeus Gadelha e Rodrigo Fernandes Alexandre, 2014.

Ptak R.G., et al. Cataloguing the HIV type 1 human protein interaction network. **AIDS research and human retroviruses**, 24(12):1497-502, 2008.

Qasim W., et al. Lentiviral vectors for T-cell suicide gene therapy: preservation of T-cell effector function after cytokine-mediated transduction. **Mol. Ther.**, 15(2):355-360, 2007.

Ron I., Horowitz M. **ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity.** **Hum. Molec. Genet.**, 14:2387-2398, 2005.

Salmon F., Grosios K., Petry H. Safety profile of recombinant adenoassociated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec (GlyberaR). **Expert Ver. Clin. Pharmacol.**, 7:53-65, 2014.

Shaaltiel Y., et al. Human lysosomal protein from plant cell culture. **Patent Number:US 8:227, 230B2**, 2012.

Sharma A.K., Bukau B., O'Brien E.P. Physical origins of codon positions that strongly influence cotranslational folding: a framework for controlling nascent-protein folding. **J. Am. Chem. Soc.**, 138:1180-1195, 2016.

Sawkar A.R., et al. Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders – a focus on Gaucher disease. **Cell Mol. Life Sci.**, 63(10): 1179-1192, 2006.

Sharp P.M., Tuohy T.M., Mosurski K.R. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. **Nucleic Acids Res.**, 14:5125-5143, 1986.

Sharp P.M., et al. DNA sequence evolution: the sounds of silence. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B**, 349:241-247, 1995.

Sharp P.M., et al. Variation in the strength of selected codon usage bias among bacteria. **Nucleic Acids Res.**, 33:1141-1153, 2005.

Sidransky E. Gaucher disease: Insights from a rare Mendelian disorder. **Discov. Med.**, 14:273-281, 2012.

Sinclair G., Choy F.Y. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Protein Expr. Purif.**, 26:96-105, 2002.

Sobreira E., et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type 1: A comparation between Brazil and the rest-of-the-world. **Mol. Genet. Metab.**, 90:81-6, 2007.

Song M., et al. Clonal selection of high producing, stably transfected HEK293 cell lines utilizing modified, high-throughput FACS screening. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 86(7):935-941, 2011.

Sorensen M.A., Pedersen S. Absolute in vivo translation rates of individual codons in *Escherichia coli*. The two glutamic acid codons GAA and GAG are translated with a threefold difference in rate. **J. Mol. Biol.**, 222:265-280, 1991.

Sorge J., et al. Heterogeneity in type I Gaucher disease demonstrated by restriction mapping of the gene. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 82(16):5442-5445, 1985.

Sorge J., et al. Complete correction of the enzymatic defect of type I Gaucher disease fibroblasts by retroviral-mediated gene transfer. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 84:906-909, 1987.

Spencer H.T., et al. Lentiviral vector platform for production of bioengineered recombinant coagulation factor VIII. **Mol. Ther.**, 19(2):302-309, 2011.

Stein P., et al. Hyperferritinemia and iron overload in type 1 Gaucher disease. **Am. J. Hematol.**, 85:472-476, 2010.

Stirnemann J., et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, p.18, 2017.

Tavares K., et al. Transient Expression of Functional Glucocerebrosidase for Treatment of Gaucher's Disease in the Goat Mammary Gland. **Molecular biotechnology**, 58(1):47-55, 2016.

Tekoah Y. et al. Glycosylation and functionality of recombinant  $\beta$ -glucocerebrosidase from various production systems. **Bioscience Reports**, (33)5:771-781, 2013.

Thomas P., Smart T.G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, 51:187-200, 2005.

Tiscornia G., Singer O., Verma I.M. Production and purification of lentiviral vectors. **Nat. Protoc.**, 1(1):241-5, 2006.

Tomás H.A., et al. Lentiviral gene therapy vectors: challenges and future directions. In: Gene Therapy: Tools and Potential Applications, **F. Martin**, eds. (InTech), 2013.

Tsuji S., et al. Nucleotide sequence of cDNA containing the complete coding sequence for human lysosomal glucocerebrosidase. **J. Biol. Chem.**, 261(1):50-53, 1986.

Twyman R.M., Whitelaw B. Genetic engineering: Animal cell technology, in The Encyclopedia of Cell Technology (Spier, R.E., ed.), **John Wiley and Sons, New York, NY**, 737-819, 2000.

Tylki-Szymańska A., Keddache M., Grabowski G.A. Characterization of neuronopathic Gaucher disease among ethnic Poles. **Genet. Med.**, 8:8-15, 2006.

UPLYSO: alfataliglicerase. Karmiel (ISR): **Protalix Biotherapeutics** [bula de medicamento].

Varmus H., Brown P. Retroviruses. In: D. E. Berg and M. M. Howe (eds.), **Mobile DNA**, **American Society for Microbiology, Whashington, D.C.**, 53-108, 1989.

Vellodi A., et al. Management of neuronopathic Gaucher disease: revised recommendations. **J. Inherit. Metab. Dis.**, 32:660-664, 2009.

Vicario S., et al. Developmental Stage and Level of Codon Usage Bias in Drosophila. **Molecular Biology and Evolution**, 25(11):2269-2277, 2008.

Vogel C., et al. Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. **Mol. Syst. Biol.**, 6:400, 2010.

VPRIV: alfavelaglicerase. Cambridge (MA-EUA): **Shire Human Genetics Therapies Inc.** [bula de medicamento].

Zhang B., et al. The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events. **Genet. Vaccines Ther.**, 2:6, 2004.

Zhou J., et al. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. **Journal of Virology**, 73:4972-4982, 1999.

Zimran A., Elstein D. Gaucher disease and related lysosomal storage diseases. In: Kaushansky K, Lichtman M, Prchal J, et al., eds. **Williams Hematology**. 9th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 2016.

Zimran A., et al. Demographics and patient characteristics of 1209 patients with Gaucher disease: Descriptive analysis from the Gaucher Outcome Survey (GOS). **Am J Hematol.**, 93:205–212, 2017.

Zuben E.S., Chava K.S., Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. **Nat. Ver. Genet.**, 12:683-691, 2011.

Zuckerandl E., Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. **J. Theor. Biol.**, 8:357-366, 1965.

Zufferey R., et al. Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery. **J. Virol.**, 72(12):9873-80, 1998.

Wagner R., et al. Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors. **Hum. Gene Ther.**, 11:2403-2413, 2000.

Wang X., et al. Efficient and sustained transgene expression in human corneal cells mediated by a lentiviral vector. **Gene Ther.**, 7(3):196-200, 2000.

Wang R., et al. Promoter-dependent enhanced green fluorescent protein expression during embryonic stem cell propagation and differentiation. **Stem Cells and Development**, 17:279-289, 2008.

Wang D., Álvarez-Cabrera A.L., Chen X.S. Study of SV40 large T antigen nucleotide specificity for DNA unwinding. **Virology Journal**, 14:79, 2017.

Weinreb N., et al. Imiglucerase (cerezyme) improves quality of life in patients with skeletal manifestations of Gaucher disease. **Clin. Genet.**, 71:576-588, 2007.

Weiss K., et al. The clinical management of type 2 Gaucher disease. **Mol. Genet. Metab.**, 114:110-22, 2015.

Welch M., et al. You're one in a googol: optimizing genes for protein expression. **J.R. Soc., Interface** 6 (Suppl. 4):S467-S476, 2009.

Wurm F.M., Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nat. Biotechnol.**, 22:1393-1398, 2004.

Yang C., et al. Mutant glucocerebrosidase in Gaucher disease recruits Hsp27 to the Hsp90 chaperone complex for proteasomal degradation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 112:1137-1142, 2015.

## 11 ANEXO

**SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Prezada Dr<sup>a</sup> Marcia Guimarães Villanova,

Eu, Ana Carolina Coelho, do departamento de Pós-Graduação de Genética, orientada pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Aparecida Maria Fontes, e pesquisadora responsável pelo estudo “Geração de linhagem celular humana 293-FT com produção permanente da Beta glucosilceramidase selvagem e mutante”, solicito a dispensa da apresentação do TCLE, considerando o que se segue:

No desenvolvimento deste projeto serão realizadas análises de quantificação da enzima GCCase extra e intracelular produzida pela linhagem 293-FT comercial (Invitrogen®) e por 2 linhagens geradas durante o projeto, com produção permanente da enzima GCCase, linhagens essas, derivadas da 293-FT comercial. Essas análises de atividade biológica são realizadas por meio de ensaio fluorimétrico e, para tanto, faz-se necessário o uso de leucócitos, adquiridos por meio de coleta de sangue fresco de indivíduo saudável, para ser utilizado como valor referência da técnica. Desta forma, eu, Ana Carolina Coelho me disponibilizo para a coleta de sangue, para a obtenção desses leucócitos referência.

**Justificativa quanto dispensa do TCLE:** Como descrito, o sangue coletado será utilizado apenas como valor de referência padrão para uma técnica já bem estabelecida. E considerando que não será necessário a coleta de controles e pacientes, apenas o meu, acredito que não há necessidade do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

Assim, esclareço que assumo a total responsabilidade pelas informações apresentadas.



Atenciosamente,

Ana Carolina Coelho

Não há necessidade de submissão ao  
Comitê de Ética em Pesquisa:  
*Marcia Guimarães Villanova*  
Dra. Marcia Guimarães Villanova  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
do HC e FMRP-USP

07/02/2018

Ana Carolina Coelho  
Pós-graduanda em Genética  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo

Ribeirão Preto, 18 de abril de 2018.

## 12 APÊNDICE

Manuscrito a ser publicado resultante da tese

### **Synonymous codon usage bias and biological activity of human glucocerebrosidase in HEK293FT cell line by recombinant lentivirus vector**

Ana Carolina Coelho<sup>1</sup>, Frederico Guilherme Freitas Lobão Rodrigues Gomes<sup>1</sup>, Gabriella Macedo Mascarenhas Diniz<sup>1</sup>, Jéssica Luana Souza Cardoso<sup>1</sup>, Cláudia Emília Vieira Wiesel<sup>1</sup>, Aguinaldo Luiz Simões<sup>1</sup>, Zilá Luz Paulino Simões<sup>1</sup>, Carlos Gilberto Carlotti Jr<sup>2</sup>, Daniela Pretti da Cunha Tirapelli<sup>2</sup>, Vitor Marcel Faça<sup>3</sup>, Vania D’Almeida<sup>4</sup>, Velia Siciliano<sup>5</sup>, Ron Weiss<sup>5</sup>, Stanton Gerson<sup>6</sup>, Aparecida Maria Fontes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Psychology, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Biological Engineering; Department of Electrical Engineering and Computer Science, Cambridge, Massachusetts, United States.

<sup>6</sup>Department of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, United States.

#### **Correspondence:**

Aparecida Maria Fontes, PhD.

Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School

Avenue Bandeirantes, 3900

14049-900 Ribeirão Preto, Brazil

Telephone + 55.16.3315.3151

E-mail: aparecidamfontes@usp.br

## Abstract

Gaucher disease (DG), caused by mutations in the GBA1 gene, is the first lysosomal storage disease described and has become the model for the clinical and phenotypic description of the diseases in that group. Enzyme replacement therapy is the main treatment available for patients with DG, but high cost. Thus, for generation of GBA stable expression and also to obtain high enzymatic levels, a strategy is the use of lentiviral system added to synonymous mutations. To achieve this goal, transient transfection was first performed to assess whether the lentiviral vectors were functional, which was demonstrated by the increase of GBA activity in the supernatant of the lineages by the biological activity assay of GCCase. From these results lentiviral particles were produced relating to the GBA cDNA sequences with the synonymous codons. The lentiviral titer was obtained by qPCR, and resulted in about  $7.88 \times 10^8$  PV/mL, LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup>. Analyzes of biological activity in the supernatant of the L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM lineage was 329.7 (+ 15.51) U/mL and 439.5 (+ 12.03) U/mL, after treated with puromycin (1 and 5ug/ml). This were 62 more than virgin lineage. In relation to the clones that presented higher levels of GBA activity, we had clone 15 (585.46 U/mL) and 16 (683.95 U/mL) for L17. Intracellular activity for the mixed population of L17 was 307.5 U/mg and for clones 15 and 16 were about 586.3 and 752.3 U/mg. In this way, we conclude that the lentiviral system was effective and the lineage with higher levels of GCCase activity was generated in comparison to our control lineage.

Keywords: Gaucher Disease. Glucosylceramide beta. Recombinant Enzyme. Lentiviral System.

## Introduction

Gaucher disease (GD) is an autosomal recessive genetic disorder caused by  $\beta$ -glycosylceramidase (GBA) gene mutations. GBA is a lysosomal enzyme and hydrolyses the  $\beta$ -glycosidic linkage in the glycosylceramide (GlcCer) lipid (Beutler and Grabowski, 2001; Jmoudiak and Futerman, 2005; Baris, Cohen and Mistry, 2014). The GlcCer accumulation leads to pathological symptoms related with the disease, since GlcCer is a biological membrane constituent and intermediate in the sphingolipid synthesis and degradation pathways (Jmoudiak and Futerman, 2005). GD is the most common lysosomal storage disease and presents heterogeneous clinical conditions ranging from non-neuropathic (type 1) (Sidransky, 2012) to chronic (type 2) and acute (type 3) which are neuropathic forms (Tylki-Szymańska, Keddache and Grabowski, 2006; Pastores, 2010). Currently, enzyme replacement therapy is the most effective treatment for GD patients, but it is an expensive medicine. According to data from the Brazilian public health agency (Ministério da Saúde, 2007), in 2007, the Brazilian government spend more than R\$250 million to provide enzyme replacement therapy for 500 GD patients. Among other factors, the recombinant protein production itself is expensive, which leads to an increase in the price, and also indicates that production methods must be optimized.

Different expression systems have already been tested for recombinant GBA production. Some authors used yeast-based systems (Sinclair and Choy, 2002), insect cells (Martin et al., 1988), and plants cells, carrot root cells were approved for commercialization in 2012 by the FDA (Shaaltiel et al., 2012). Mammalian cells such as CHO were also approved by the FDA for commercialization in 1996, other studies were developed in CHO line (Novo et al., 2012), as well as expression systems in HEK 293 lineages (Kim et al., 2004) as also presented in this work. Despite the protein levels obtained non-human systems, the production in human cell strains is still an attractive option, since it has the capacity to produce proteins more similar to those synthesized naturally in humans (Ghaderi et al., 2010).

A promising methodology option aiming to improve recombinant protein production are synonymous codons. These codons variants encode the same amino acid residue, which leads to the formation of different nucleotide sequences, but express the same protein product (Zuckerandl and Pauling, 1965). A study using *Pichia pastoris* evaluated the synonymous codons impact on the GBA protein expression, the authors observed a 10.6 times protein increase and more biological activity after the preferential codons usage in a fragment of 186 bp (Sinclair and Choy, 2002). Another study analyzed the papillomavirus capsid L1 and L2 proteins expression level in Cos-1 cells using preferential papillomavirus versus preferential mammalian codons, the use of preferential mammalian codons increased 1000 times the capsid

proteins production in the host cell (Zhou et al., 1999). It was initially believed that these mutations were neutral, since they did not alter the polypeptide sequence, which could mean that they had no effect on the cellular fitness or organisms function (King and Jukes 1969, Plotkin and Kudla, 2011). However, recent studies have shown that sequence variation due to the redundancy of the genetic code, as well as the multiple possibilities of transcription, may allow natural selection (Sharp et al., 1995; Plotkin and Kudla, 2011).

The expression systems of choice to produce GCCase must allow the enzyme stable production in order to obtain higher levels of enzymatic activity. Lentiviruses (LV) are RNA viruses capable of transducing cells that are not in the process of cell division, being their main advantage in comparison to oncoretroviral vectors (Naldini et al., 1996; Merten, Hebben and Bovolenta, 2016). LV integration sites are in euchromatin regions preferably, which increases the chances to obtain active transgene expression (Spencer et al., 2011). LV vectors has been used in neurodegenerative diseases and immunodeficiency clinical trials in gene therapy (Merten, Hebben and Bovolenta, 2016).

Considering the treatment high cost for GD and knowing that the enzyme production and commercialization is exclusively under the dominance of large international companies, this work aims to develop an optimized GBA production by lentiviral system, from a GBA cDNA carrier vector with optimized codons, aiming to achieve high GCCase levels in the supernatant and the cell lysate in comparison to the non-transduced HEK-293FT lineage.

## **Material and Methods**

### **Plasmid constructs**

Lentiviral plasmids used in this study were derived from the plasmid pDEST\_R4\_R2 kindly provided by Prof. Dr. Ron Weiss - Synthetic Biology Center Director, Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology - MIT, Cambridge, MA, USA (Guye et al., 2013). Two accessory plasmid vectors were used for the production of lentiviral particles: pCMV-VSV-G (5,824 bp) and pCMV $\Delta$ R8.91 (12,120 bp). These plasmids were kindly provided by Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza - Laboratory of Molecular Biology, Hemocentro of Ribeirão Preto, SP.

## Cell culture

The lineage HEK-293FT (Cat. Number R700-07, Gibco, by Thermo Fisher Scientific) from human embryonic kidney was used as host cell. The untreated 293FT cell line was expanded and cultured in Gibco® DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum - Hyclone™ Fetal Bovine Serum (GE Healthcare Life Sciences) and 1% Gibco™ antibiotic, penicillin and streptomycin (Life Technologies). Serum was previously inactivated at 56 °C for 30 minutes. During cultivation the cell culture was kept at 37 °C and 5% CO<sup>2</sup>.

## Generation of lineages with transient production of GCase

For this experiment 1x10<sup>5</sup> 293FT cells were cultivated in 6 well plates. Transfections were performed 48 hours after plating, with reagent Attractene transfection reagent (Qiagen inc, CA, USA), according to the manufacturer's specifications. New DMEM culture medium with antibiotic (1%) and serum (10%) was added prior transfection and 6 hours' post-transfection, the medium was changed by medium without serum. The supernatant was collected 48 hours after transfection and centrifuged at 1500rpm, 10 ° C for 5 minutes.

## Recombinant lentivirus vector production and titration

Transfection assays were performed using Thermo Fisher Scientific's Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent. Each 145mm cell plate an assay containing 6.5 µg of plasmid pCMVΔR8.9, 3.2 µg of pCMV-VSV-G and 12 µg of plasmid coding the target cDNA was added. The supernatant was collected 48h and 72h after transfection. The lentiviral particles were concentrated in OPTIMATM XL 100K Ultracentrifuge ultracentrifuge (SW 28 Beckman rotor), as described by Kurtner et al. (2009). The viral titration was calculated by qPCR in real time, using TaqMan™ system from Applied Biosystems. β-actin gene was used as endogenous control Hs03023880\_g1, primers and probe for the LTR gene were 5 'GCCCGAACAGGGACTTGA 3', 5 'CGAGTCCTGCGTCGAGAGA 3' and 5 'FAM AGCGAAAGGGAAACC MGB 3'. The viral titre was calculated as described by Matsui et al. (2007), with the formula:  $\{[(\text{Average LTR copy number} * 2 / \text{Average } \beta\text{-actin copy number}) * \text{cell plated number}] * \text{dilution factor}\}$ . The lentiviral transductions were performed with MOI between 30-60.

***In vitro* GCCase extracellular Production HEK 293FT Virgin and L17\_293FT\_GBA\_SYN**

The cell lines generated were cultivated in a high stringency treatment with puromycin antibiotic (Gibco™ Sterile Puromycin Dihydrochloride). The selective media was kept for 10 days in order to select the transduced cells, since the insertion sequence presented the puromycin resistance gene. To obtain single-cell clones, firstly,  $1 \times 10^3$  transfected cells were cultivated in 100mm cell plates. One week later it was possible to observe individualized clonal colonies. These populations were trypsinized and transferred to 6 well plates.

For the GCCase biological activity experiment of the heterogeneous transfected population, the clones generated and the virgin line (control),  $3 \times 10^5$  cells were plated per well of 6-well plate, new culture medium was added 48h after the plating, with 10% SBF. After another 48h, the cell supernatant was collected.

***In vitro* GCCase intracellular production by HEK 293FT Virgin and L17\_293FT\_GBA\_SYN**

To evaluate the GCCase intracellular activity,  $2 \times 10^5$  cells were cultivated in 6-well plates. After 48h, new culture medium was added (DMEM supplemented with 10% Serum and 1% antibiotic). And after 48h, the supernatant was discarded, and to each well 245 $\mu$ L of Mammalian Protein Extraction Buffer (GE Healthcare Life Sciences) plus 5 $\mu$ L of the protease inhibitor cocktail, from Sigma-Aldrich, was added. The cell lyses was stored at -80 °C.

***In vitro* extracellular and intracellular GCCase biological activity**

The GCCase biological activity assay was performed in a 100 $\mu$ L reaction, 20 $\mu$ L of Sodium taurodeoxycholate hydrate (TDC) - Sigma-Aldrich (2% TDC + 1M phosphate citrate buffer); 50 $\mu$ L of substrate (4MUG); 30 $\mu$ L of the sample. The samples were incubated for 2h, 100rpm at 37°C in a water incubator. The fluorescence was measured by SpectraMax M2 fluorimeter (Molecular Devices) with excitation of 360nm and emission of 450nm. Quality control (leukocyte) and intracellular samples were sonicated and the amount of total protein present in the sample was assayed by the Lowry method using the commercial DCTM Protein Assay kit (BioRad) according to the manufacturer's recommendations. For data analysis, it was defined that a unit of biological activity is the amount of enzyme required to release 1 nmol of 4 MU per hour. For supernatant samples are measured in milliliter of culture medium, and for intracellular samples the unit is milligram of total protein.

## Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using the non-parametric t test with Welch's correction, with p-value set at 0.05. The graphs were generated by GraphPad Prism software version 7.00 (GraphPad Software, San Diego California USA).

## Results

Promising GCCase biological activity levels were observed in transient lines and in the cell supernatant GCCase was shown to be biologically active. The transient transfected cell line containing the empty vector obtained secreted GCCase activity of 4.69 ( $\pm$  1.96) U/mL, whereas the line transfected GBA wild-type plasmid showed GCCase activity of 6.62 ( $\pm$  2.11) U/mL and 2.77 ( $\pm$  0.17) U/mL under the control of the CMV and HeF1 $\alpha$  promoters, respectively. GCCase enzyme activity levels in the extracellular medium were 25.61 ( $\pm$  5.4) U/mL and 133.2 ( $\pm$  26.17) for the line transfected with optimized plasmid ( $p = 0.057$ ) and 48.13 times greater ( $p = 0.038$ ) than the wild-type GBA sequence under the control of the same promoters. Compared to the cell line transfected with the MOCK vector, GCCase activity levels in the 293FT/CMV\_GBA\_SYN lineage supernatant was 5.47 times higher ( $p = 0.047$ ) and 28.4 times higher than the 293FT lineage/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN ( $p = 0.038$ ). In relation to the line transfected with the wild-type GBA plasmids, the 293FT/CMV\_GBA\_WT line showed levels of GCCase activity in the cell supernatant about 1.4 times greater than the transfected lineage with the empty vector ( $p = 0.53$ ). And the MOCK-transfected line had 1.7 fold higher GCCase activity ( $p = 0.40$ ) than 293FT/HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT cell line (Figure 1).

LV\_HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN\_P<sup>+</sup> viral titer was  $7.88 \times 10^8$  viral particles per milliliter (PV/mL), and after six cycles of lentiviral transduction the heterogeneous population L17\_293FT\_GBA\_SYN was obtained. GCCase activity analysis from this heterogeneous population supernatant after treatment with low (1 $\mu$ g/mL) and high (5 $\mu$ g/mL) puromycin stringency was performed. The results showed that GCCase activity levels of 7.038 ( $\pm$  0.2) U/mL in the virgin line supernatant and 329.7 ( $\pm$  15.51) U/mL in the L17\_293FT\_GBA\_SYN line supernatant treated with 1 $\mu$ g/mL of puromycin, which is about 47-fold higher ( $p = 0.0002$ ). The same population treated with 5 $\mu$ g/mL puromycin showed GCCase activity of 439.5 ( $\pm$  12.03) U/mL, which was 62 times higher than the virgin line ( $p < 0.0001$ ). Puromycin stringency had positive results, since the GCCase activity in cells treated with 5 $\mu$ g/mL puromycin was 1.3 times higher than the treatment with low stringency ( $p = 0.0017$ ) (Figure 2).

The extracellular activity analyzes were performed in 11 clones derived from the heterogeneous population L17\_293FT\_GBA\_SYN. Clone 7 showed the GCCase biological activity, with an average of 89.9 U/mL, yet the activity levels were about 9 times higher than the virgin line. Clones 15 and 16 were the most productive with GCCase activity levels of 585.4 U/mL and 683.9 U/mL, respectively. These results indicate that cell cloning was effective, with the most productive clones (clones 15 and 16) activity being 57 and 66 times higher than the virgin cell line (Figure 3).

The intracellular biological activity analysis was performed in the 11 clones, heterogeneous population and virgin cell line. The virgin 293FT untreated cell line presented 95.58 ( $\pm$  8,249) U/mg of GCCase activity. The L17 mixed population showed average mean of 307.5 ( $\pm$  26.74) U/mg in the intracellular analysis, which was 3.21 times higher in comparison to virgin ( $p = 0.0026$ ). Clone 15 from L17 line obtained 586.3 ( $\pm$  185.9) U/mg of GCCase intracellular activity, which was 1.9 fold higher when compared to the mixed population ( $p = 0.23$ ). Clone 16 presented an average mean of 752 ( $\pm$  76.05) U/mg, which represents 2.45 times more when compared to the mixed population ( $p = 0.006$ ) and 1.28 times more than the clone 15 ( $p = 0.46$ ). In comparison to the virgin line, clone 16 obtained a 8-fold higher intracellular GCCase activity ( $p = 0.003$ ) (Figure 4).

## Discussion

Considering GCCase production obtained from transient transfection cell lines, the optimized GBA cDNA plasmid transfected cells with HeF1 $\alpha$  promoter showed GCCase activity of 133.19 U/mL (+ 26.17), which was 5.2-fold higher compared to the same sequence under the CMV promoter and 48-fold higher considering the original GBA sequence with HeF1 $\alpha$  promoter plasmid. Aiming to create a permanent cell line with stable GCCase production, the most promising plasmid was chosen. The plasmid selected was optimized sequence that obtained functional GCCase production and the higher activity levels in the cell supernatant compared to the original sequence. For this molecule, the viral titration showed  $7.88 \times 10^8$  viral particles/mL.

The lentiviral vectors usage in gene therapy for the treatment of genetic and acquired diseases had a significant increase in the last years (Merten, Hebben and Bonovolenta, 2016). In special, the HEK293 cell line has been selected as a tool for recombinant proteins expression for more than 25 years, since it presents the biochemical machinery capable of performing the

correct folding and post-translational processing necessary for the generation of functional proteins (Thomas and Smart, 2005).

Considering the L17 mixed population to the 293FT virgin cell line, when kept in medium with 10% FBS, the first presented GCCase activity levels of 47 and 62 higher than the virgin after treatment with 1 and 5  $\mu\text{g/mL}$  of puromycin, respectively. These results show that optimized sequence line produces promising GCCase levels. The optimized human GBA sequence has already been tested in other expression systems, for example, in *Pichia pastoris*. Sinclair and Choy (2002) fused GBA cDNA fragments with luciferase fragments, which worked as a reporter gene. In order to analyze the GBA expression, codon optimization was performed according to the preferred *P. pastoris* codons set for 186 bp in the GBA gene. The authors described that while GBA expression from the original sequence had limited luciferase expression, the optimized construct allowed an increase in luciferase expression in 10.6 times, which contributed to the GBA heterologous expression.

It is known that human GBA heterologous production has already been studied in several expression systems. Cramer et al. (1996) was the first group to report a human lysosomal enzyme stable production in transgenic plants. And despite having different post-transcriptional modifications that mammalian cells, a 69kDa protein was identified in the transgenic tobacco plant extract and it was shown to be biologically active, indicating that a significant enzyme portion is glycosylated and folded correctly.

The GCCase extracellular biological activity in transduced human myoblasts, described by Liu et al. (1998), was about 50U/mL, which is about 50 times more than the control (non-transduced lineage). Our data showed GCCase activity levels 46.8 times higher in the L17 mixed population supernatant when compared to virgin supernatant. And, the most productive L17 clones presented 585.4 U/mL (clone 15) and 683.9 U/mL (clone 16) of GCCase activity in the cell supernatant.

A number of steps are required when generating transgenic cell lines, including obtaining cell clones, since there are an integration site effect and the transcription rate of the target gene is known in the heterologous population. Mammalian cell lines such as CHO (Chinese hamster ovary), NS0 (murine B lymphocyte derived myeloma cell line), Sp2/0 (murine B lymphocyte hybridoma derived lymphoblastoid cell line), BHK (hamster kidney) and HEK (human embryo kidney) are the preferred systems for the production of recombinant proteins, since they have shown favorable properties for the functional and bioactive biopharmaceuticals production (Wurm, 2004). The HEK-293 lineage is commonly used thanks to its high transfection rate and high transient expression levels (Backliwal et al., 2008). Viral

vectors stable expression is also greatly considered (Kim et al., 2009). Song and collaborators (2011) selected 55 clones from 5% fluorescent cells from the heterogeneous population, using the HEK-293 lineage. The most productive clones had 5 to 7 times higher production levels than the heterogeneous population, and it was possible to scale up the production to a 25-liter system. These experiments indicate that this is an efficient biopharmaceutical production system and also able to be scale up in considerable amounts, which can be used for preclinical tests development.

After performing single cell cloning, our results showed that the clone 15 GCCase activity in the supernatant was 5.6 times higher compared to the mixed population, and also, clone 16 GCCase production was 6.5 fold higher. Kim et al. (2004) performed a lentiviral transfection in three different strains: HeLa, SH-SY5Y and HEK 293 (MOI among 10-50) with GBA cDNA sequence vector and measured the GCCase activity five days after transduction. The GBA sequence was under CMV and HeF1 $\alpha$  promoter control and the activity highest levels were obtained in the transduced lines with HeF1 $\alpha$  promoter. On average the GCCase activity in the supernatant were 189 U of GBA/mL, 2.4 times higher than the non-transduced strains average (80 U of GBA/mL).

Kim et al. (2004) carried out the experiments in culture medium with 10% FBS and, aiming to inhibit endogenous GCCase, cells were incubated with 1mM conduritol epoxide (CBE) (Kim et al., 2004). In the present study we obtained considerable GCCase activity levels from the optimized GBA cDNA lentiviral vector. The GCCase analysis in the L17 mixed population supernatant, in culture with 10% FBS, were in the order of 329.7 U/mL (treated with 1 $\mu$ g puromycin) and 439.5 U/mL (treated with 5 $\mu$ g puromycin). If we take into consideration that the line generated is not GBA gene knockout and that we did not previously incubated with CBE inhibitor, we can estimate the GBA recombinant production by discounting the activity of virgin line (7.04 U/mL). And still, the recombinant lines showed high GCCase levels of 322.7 and 432.5 U/mL, respectively. Considering the activity results obtained after 48h, our system has been shown to be efficient for recombinant enzymes production and had stable expression, compared with Kim et al. (2004) GCCase production our work produced twice as much.

Considering the intracellular activity data, Kim et al. (2004), already mentioned above, obtained, on average 233 U/mg of GCCase activity from the HeLa, SH-SY5Y and HEK 293 lines, with MOI among 10-50. This result was 2.1 times higher compared to non-transduced strains production (113 U/mg). In the present study we obtained specific GCCase activity levels of 307.5 U/mg for L17 mixed population. Subtracting the basal GCCase production we conclude

that L17 population has 211.9 U/mg of GCCase activity. These results suggest that the L17 line has promising recombinant enzyme GCCase production levels.

Liu et al. (1998) described that the intracellular GCCase activity in human transduced myoblasts was 1700U/mg, which corresponds to 4 times more than the control. When we evaluated the GCCase specific activity after single cell cloning, we verified that it was effective since the activity levels were higher compared to the mixed population and the non-transduced line (control strain). The best L17 clones showed 586.3 (clone 15) and 752 (clone 16) U/mg of GCCase specific activity, which was 6 and 8 times higher comparing to the virgin cell line.

In the last years, several strategies for obtaining chromosomal integrated genes in animal cells have been developed. One of those are Lentiviral vectors, LVs are known to have insertion preference sites in transcriptionally active sequences, integrating without differentiating introns or exons, in addition to being associated with histone-enriched regions of the H3K36me3 type (Lusic and Siciliano, 2017; Poletti and Mavilio, 2018). The LV selection in this work possibly had a great impact on the positive results obtained. The lineage generated here has a promising GCCase production levels and has potential to be used in future experiments, aiming to reach the clinical stages.

### **Acknowledgments**

This work was supported by Agilent Technologies Brasil (Agilent), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil.

### **Author disclosure statement**

No competing financial interests exist.

### **References**

- Backliwal G., et al. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1g/L by transient transfection under serum-free conditions. **Nucleic Acids Res.**, 36:e96, 2008.
- Baris H.N., Cohen I.J., Mistry P.K. Gaucher disease: The metabolic defect, pathophysiology, phenotypes and natural history. **Pediatr Endocrinol Rev.**, 12:72-81, 2014.
- Beutler E., Grabowski G.A. Gaucher disease. In: Scriver, C., et al., editors. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill, p.3663-8, 2001.
- Cramer C.L., et al. Radin, Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco, **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 792:62-71, 1996.

- Ghaderi D., et al. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. **Nature Biotechnology**, 28(8):863-7, 2010.
- Jmoudiak M., Futerman A.H. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. **Br. J. Haematol.**, 129:178-88, 2005.
- Kim E.Y., et al. Expression and secretion of human glucocerebrosidase mediated by recombinant lentivirus vectors in vitro and in vivo: implications for gene therapy of Gaucher disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 318:381-390, 2004.
- Kim K.S., et al. Enhancement of recombinant antibody production in HEK 293E cells by WPRE. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, 14:633-638, 2009.
- King J.L., Jukes T.H. Non-Darwinian evolution: Random fixation of selectively neutral mutations. **Science**, 164:788-798, 1969.
- Kutner R.H., Zhang X.Y., Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. **Nature Protocols**, 4:11, 2009.
- Liu C., et al. Long-term expression and secretion of human glucocerebrosidase by primary murine and human myoblasts and differentiated myotubes, **J. Mol. Med.**, 76:773-781, 1998.
- Lusic M., Siciliano R.F. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. **Nature Reviews Microbiology**, (15)2:69-82, 2017.
- Matsui H., et al. Ex vivo gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained in vivo factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors. **Stem Cells.**, 25(10):2660-9, 2007.
- Merten O-W., Hebben M., Bovolenta C. Production of lentiviral vectors. **Molecular Therapy Methods & Clinical Development**, 3:16017, 2016.
- Naldini, L., et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, 272:263-7, 1996.
- Novo J.B., et al. Generation of a Chinese hamster ovary cell line producing recombinant human glucocerebrosidase. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012:875383, 2012.
- Pastores G.M. Neuropathic Gaucher disease. **Wien. Med. Wschr.**, 160:605-608, 2010.
- Plotkin J.B., Kudla G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. **Nat. Rev. Genet.**, 12:32-42, 2011.
- Poletti V., Mavilio F. Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome. **Mol. Ther. Methods Clin. Dev.**, 8:31-41, 2018.
- Shaaltiel Y., et al. Human lysosomal protein from plant cell culture. **Patent Number:US 8:227, 230B2**, 2012.

Sharp P.M., et al. DNA sequence evolution: the sounds of silence. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B**, 349:241-247, 1995.

Sidransky E. Gaucher disease: Insights from a rare Mendelian disorder. **Discov. Med.**, 14:273-281, 2012.

Sinclair G., Choy F.Y. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Protein Expr. Purif.**, 26:96-105, 2002.

Song M., et al. Clonal selection of high producing, stably transfected HEK293 cell lines utilizing modified, high-throughput FACS screening. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 86(7):935-941, 2011.

Spencer H.T., et al. Lentiviral vector platform for production of bioengineered recombinant coagulation factor VIII. **Mol. Ther.**, 19(2):302-309, 2011.

Thomas P., Smart T.G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, 51:187-200, 2005.

Zhou J., et al. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. **Journal of Virology**, 73:4972-4982, 1999.

Zuckerandl E., Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. **J. Theor. Biol.**, 8:357-366, 1965.

Wurm F.M., Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nat. Biotechnol.**, 22:1393-1398, 2004.

**Figure 1.** Transient GCCase biological activity in the cell supernatant. (A) The 293FT / CMV\_GBA\_WT line showed GCCase enzymatic activity of 1.4 and 2.4 fold higher considering the results in MOCK and 293FT / HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT cell lines, respectively; (B) The 293FT / HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN line presented GCCase activity 28.4 times higher than MOCK cell line and 5.2 times higher than 293FT / CMV\_GBA\_SYN; (C) Among the cell lines under CMV promoter control, the 293FT / CMV\_GBA\_SYN line showed activity levels 3.87 times higher than 293FT / CMV\_GBA\_WT; (D) The 293FT / HeF1 $\alpha$ \_GBA\_SYN line showed 48-fold higher activity when compared to the 293FT / HeF1 $\alpha$ \_GBA\_WT results.

**Figure 2.** GCCase biological activity in L17\_293FT\_GBA\_SYN\_PM supernatant, in cell DMEM culture medium with 10% FBS. The L17 heterologous population treated with puromycin 5  $\mu$ g / mL produced 1.3 times more GCCase when compared to the same strain treated with 1  $\mu$ g / mL puromycin and 62.4 times higher production than the 293FT virgin cell line. In relation to the virgin, L17 treated with 1 $\mu$ g / mL puromycin had 46.8 times higher GCCase activity.

**Figure 3.** GCCase biological activity in the extracellular medium. Analysis from 11 clones generated from L17\_293FT\_GBA\_SYN, the L17 heterologous population and the virgin HEK-293FT.

**Figure 4.** Intracellular GCCase activity. The L17 heterologous population showed GCCase activity of 3.2 times higher in comparison to the HEK 293FT virgin line. Clone 16 GCCase intracellular activity was 2.45 times higher compared to the L17 heterologous population production and 1.28 times higher than clone 15 activity. Comparing clone 15 to L17 heterologous population production, the clone showed results 1.9 times higher. Clone 16 obtained intracellular GCCase activity about 8-fold higher than HEK293FT virgin line.

Figure 1

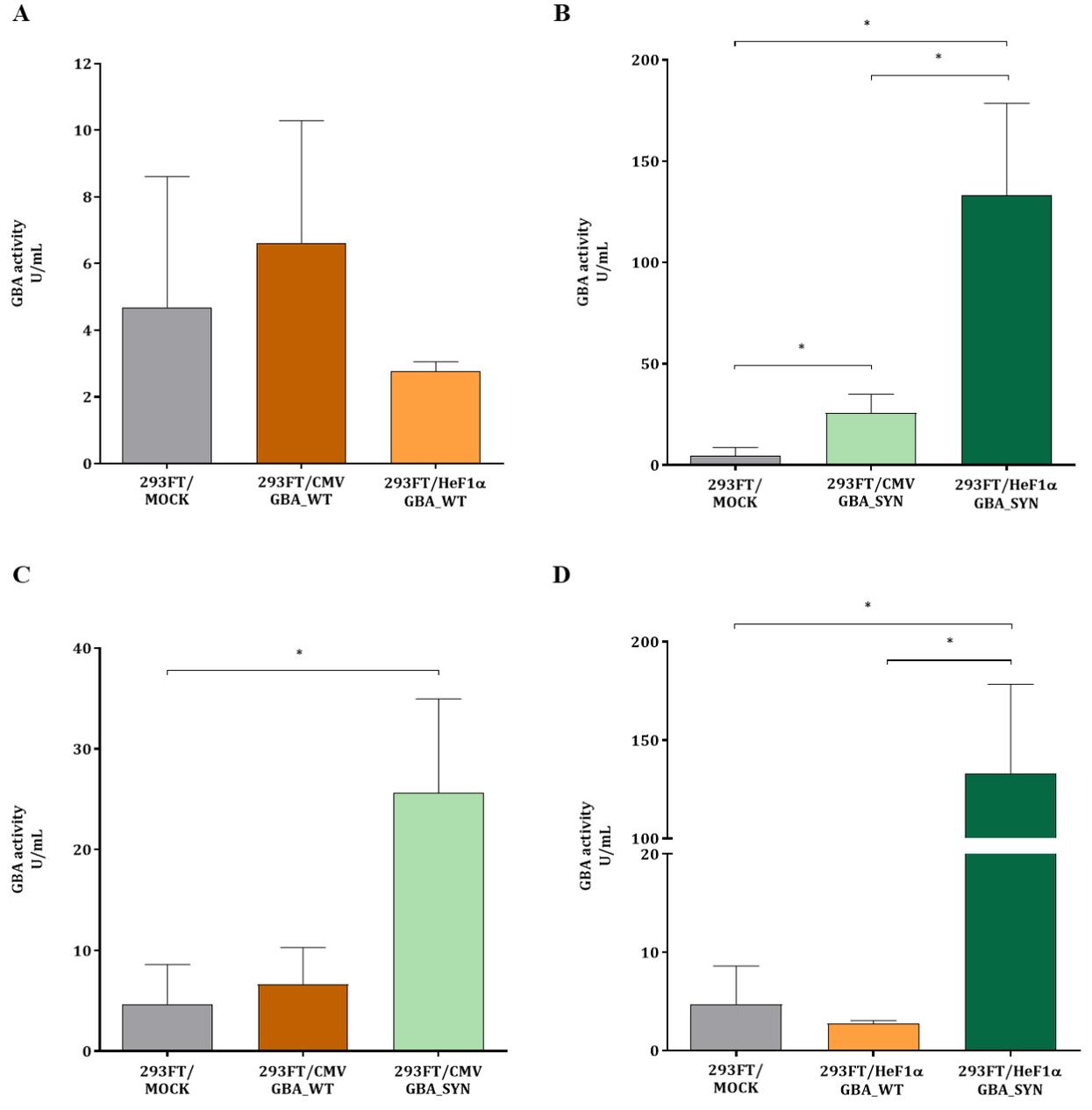


Figure 2

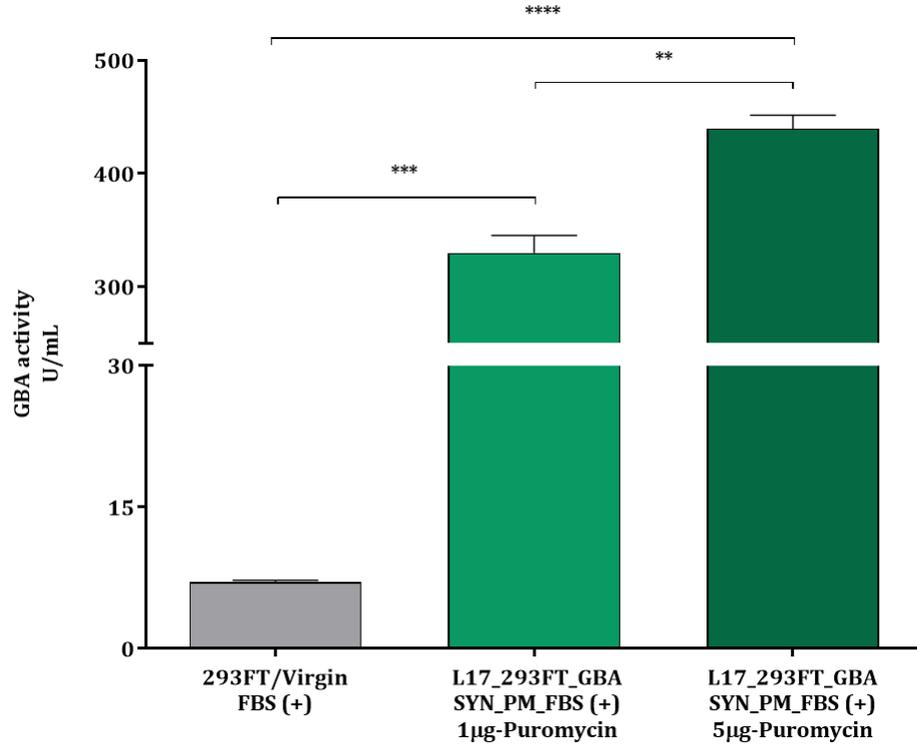


Figure 3

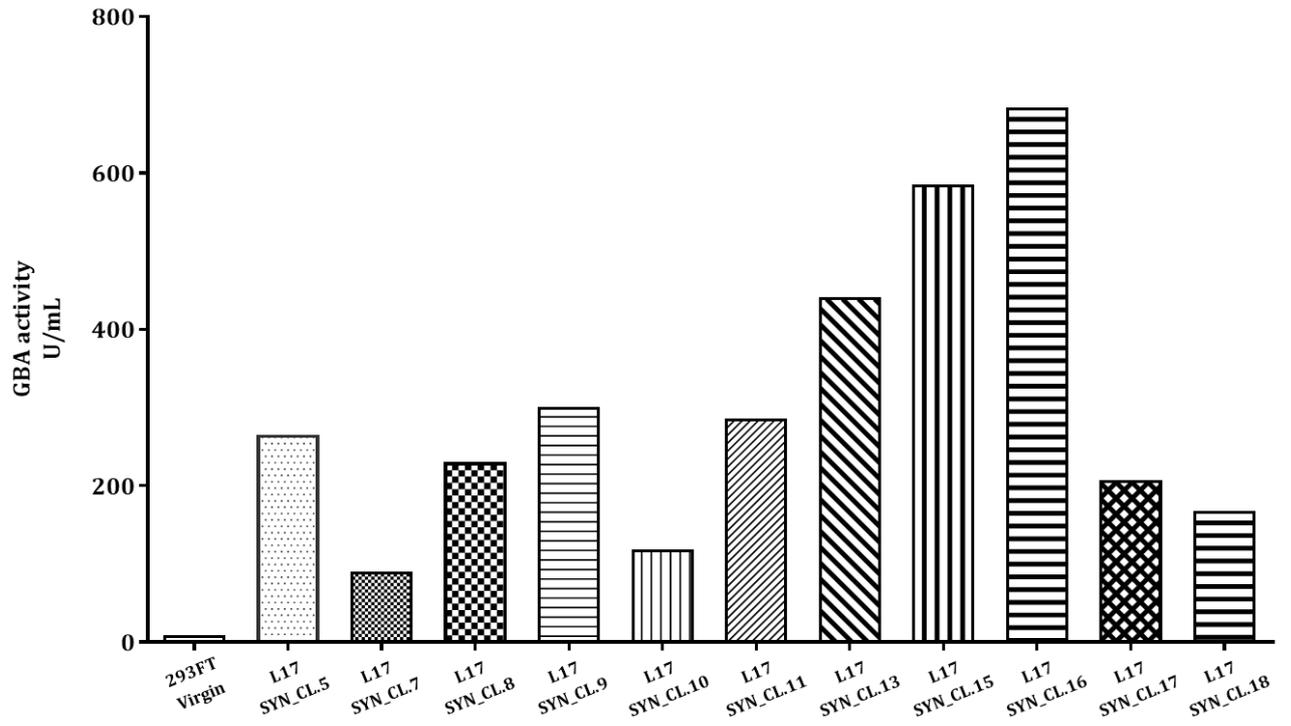


Figure 4

