

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Expressão do Gene da Glicocerebrosidase Humana em *Chlamydomonas reinhardtii*

GUILHERME PIZZOLI

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre

Orientador: Giancarlo Pasquali

Porto Alegre, março de 2016

Instituição

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Índice

Lista de abreviaturas	5
Resumo	8
Abstract	9
1. Introdução.....	10
1.1 Glicocerebrosidase.....	10
1.2 Doença de Gaucher	13
1.3 Terapia de Reposição Enzimática.....	16
1.4 Organismos para a produção de proteínas recombinantes	21
1.5 Microalgas como plataforma de produção de proteínas recombinantes	24
1.6 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	28
2. Objetivos	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3. Materiais e métodos.....	38
3.1 Construção de plasmídeos.....	38
3.1.1 Projeção de sequência e síntese do gene <i>HsGBA</i>	38
3.1.2 Adaptação de <i>HsGBA</i> e <i>gfp</i> a plasmídeo de expressão em <i>C. reinhardtii</i>	38
3.1.3 Vetor pHsp70A/RbcS2- <i>cgLuc</i>	38
3.1.4 Vetor pKS- <i>aph7</i> ⁻ -lox.....	40
3.1.5 Vetor pKSc <i>GFP</i>	41
3.1.6 Vetor pHsp70A/RbcS2- <i>HsGBA</i>	41
3.1.7 Vetor pHsp70A/RbcS2- <i>GFP</i>	42
3.1.8 Vetor pKS- <i>aph7</i> ⁻ -lox:: <i>HsGBA</i>	42
3.1.9 Vetor pKS- <i>aph7</i> ⁻ -lox:: <i>GFP</i>	43
3.2 Linhagens de <i>C. reinhardtii</i> , condições de cultivo e transformação	43
3.2.1 Estabelecimento de culturas de <i>C. reinhardtii</i>	43
3.2.2 Transformação genética nuclear de <i>C. reinhardtii</i>	43
3.2.3 Manutenção de culturas de <i>C. reinhardtii</i> transformadas com pKS- <i>aph7</i> ⁻ -lox:: <i>HsGBA</i> e com pKS- <i>aph7</i> ⁻ -lox:: <i>GFP</i>	44
3.3 Identificação de linhagens de <i>C. reinhardtii</i> <i>HsGBA</i> -positivas	45
3.4 Identificação de linhagens de <i>C. reinhardtii</i> <i>gfp</i> -positivas	47

3. 5	Análises da expressão de <i>HsGBA</i> em <i>C. reinhardtii</i>	48
3. 5. 1	Extração de RNA total e síntese de cDNA	48
3. 5. 2	Avaliação da expressão de <i>HsGBA</i> por RT-PCR.....	48
3. 5. 3	Sequenciamento de DNA.....	49
3. 5. 4	Otimização das condições de indução da expressão de <i>HsGBA</i>	49
3. 6	Ensaio para detecção da proteína recombinante HsGBA	50
3. 6. 1	Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE	50
3. 6. 2	Detecção de HsGBA por <i>western blot</i>	51
3. 6. 3	Avaliação da atividade enzimática de HsGBA em extratos proteicos.....	51
3. 7	Verificação da expressão do gene repórter <i>gfp</i>	52
4.	Resultados	53
4. 1	Adaptação de <i>HsGBA</i> e <i>gfp</i> a plasmídeo de expressão em <i>C. reinhardtii</i>	53
4. 2	Transformação genética de <i>C. reinhardtii</i>	61
4. 3	Identificação de linhagens de <i>C. reinhardtii</i> <i>HsGBA</i> -positivas	63
4. 4	Identificação de linhagens de <i>C. reinhardtii</i> <i>gfp</i> -positivas	66
4. 5	Análises da presença de mRNA de <i>HsGBA</i> em <i>C. reinhardtii</i> por RT-PCR... 66	
4. 6	Definição de tratamento e tempo de máximo acúmulo de mRNA de <i>HsGBA</i> em <i>C. reinhardtii</i>	69
4. 7	Ensaio para a detecção da proteína recombinante HsGBA em <i>C. reinhardtii</i> por SDS-PAGE e <i>western blot</i>	71
4. 8	Avaliação da atividade enzimática de HsGBA em extratos proteicos.....	72
5.	Discussão.....	74
6.	Referências Bibliográficas	88
7.	<i>Curriculum Vitae</i>	100

Lista de abreviaturas

β 2-Tub	β 2-tubulina
4-MU	4-metilumbeliferona
4-MUG	4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosídeo
AMA1	antígeno da membrana apical de <i>Plasmodium berghei</i> (do inglês, <i>apical major antigen</i>)
<i>AmpR</i>	gene marcador de seleção para ampicilina (do inglês, <i>ampicillin resistance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>aph7</i> ⁺	gene codificador da enzima aminoglicosídeo fosfotransferase
ARC5-I	arcelina 5-I
ARS	arilsulfatase
BoNT/A	neurotoxina botulínica sorotipo A (do inglês, <i>botulinum neurotoxin serotype A</i>)
CD22	cluster de diferenciação 22 (do inglês, <i>cluster of differentiation</i>)
<i>cGFP</i>	gene codificador da proteína GFP com códons otimizados para expressão nuclear em <i>C. reinhardtii</i>
<i>cgLuc</i>	gene codificador da enzima luciferase de <i>Gaussia princeps</i> com códons adaptados para expressão em <i>C. reinhardtii</i>
CHO	ovário de hamster chinês (do inglês, <i>Chinese hamster ovary</i>)
COP	clamiopsina-1
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês, <i>cetyl trimethylammonium bromide</i>)
CTB	subunidade β da toxina da cólera (do inglês, <i>cholera toxin B subunit</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
<i>Dnmt1</i>	DNA (citosina-5-) metiltransferase (do inglês, <i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase</i>)
dNTP	desoxirribonucleosídeo trifosfatado (do inglês, <i>deoxynucleoside triphosphate</i>)
ETA	exotoxina A de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
GBA	glicocerebrosidase
GBSS	amido sintase ligada ao grânulo (do inglês, <i>granule bound starch synthase</i>)

GFP	proteína de fluorescência verde (do inglês, <i>green fluorescent protein</i>)
hGAD65	enzima ácido glutâmico descarboxilase humana 65 (do inglês, <i>human glutamic acid decarboxylase 65</i>)
HMGB1	proteína de grupo B1 de elevada mobilidade (do inglês, <i>high mobility group protein B1</i>)
HPV	papiloma vírus humano (do inglês, <i>human papiloma virus</i>)
HsGBA	glicocerebrosidase humana
HSP70A	proteína de choque térmico 70A (do inglês, <i>heat shock protein 70A</i>)
HSV	vírus Herpes simplex (do inglês, <i>Herpes simplex vírus</i>)
<i>KanR</i>	gene marcador de seleção para canamicina (do inglês, <i>kanamycin resistance</i>)
LIMP-2	proteína integral da membrana lisossomal do tipo 2 (do inglês, <i>lysosomal integral membrane protein 2</i>)
Luc	luciferase
MAA	proteína amiloide do colostro de mamíferos (do inglês, <i>mammary-associated serum amyloid</i>)
mRNA	RNA mensageiro
MSP1	proteína de superfície de <i>Plasmodium berghei</i> (do inglês, <i>major surface protein</i>)
ori	origem de replicação
PA83	antígeno protetor de <i>Bacillus anthracis</i> 83 (do inglês, <i>protective antigen 83</i>)
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	polietilenoglicol
Pfs	proteína da superfície de <i>Plasmodium falciparum</i> (do inglês, <i>Plasmodium falciparum surface protein</i>)
<i>RBCS2</i> ou <i>RBCS2B</i>	gene codificador da subunidade menor da RuBisCO
RNA	ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
RT-PCR	transcrição reversa seguida da reação em cadeia da DNA polimerase (do inglês, <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RuBisCO	ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (do inglês, <i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase</i>)
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)

Sep15	selenoproteína humana de 15 kDa
SUS	Sistema Único de Saúde
TAP	meio Tris-acetato-fosfato (do inglês, <i>Tris-Acetate-Phosphate</i>)
TD-PCR	do inglês, <i>touchdown PCR</i>
TRAIL	proteína ligante indutora de apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral (do inglês, <i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>)
tRNA	RNA transportador
UTR	região não traduzida (do inglês, <i>untranslated region</i>)
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular humano (do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>)

Resumo

Considerada a mais comum das doenças lisossômicas, a doença de Gaucher é causada por mutações no gene *GBA1* que resultam na síntese defeituosa da enzima glicocerebrosidase (GBA), responsável pela hidrólise dos glicocerebrosídeos em glicose e ceramida. A deficiência da enzima provoca o acúmulo desses glicolipídios nos macrófagos, principalmente no fígado, no baço e na medula óssea, levando a um fenótipo complexo. O tratamento da doença consiste na administração da enzima GBA humana (HsGBA) exógena e, apesar de sua eficácia, é extremamente oneroso. Assim como outras espécies de microalgas, *Chlamydomonas reinhardtii* apresenta alto potencial para a produção de grandes quantidades de proteínas recombinantes de forma rápida e a um custo muito inferior ao dos sistemas de expressão tradicionais. O objetivo proposto para o desenvolvimento deste trabalho foi a expressão do gene codificador da HsGBA a partir do genoma nuclear de *C. reinhardtii* visando à produção da proteína como possível alternativa para a terapia de reposição enzimática. O gene *HsGBA* artificial foi projetado com códons adaptados para a expressão nuclear em *C. reinhardtii* e com sítios de restrição. A sequência nucleotídica foi sintetizada pela empresa GenScript USA Inc. e, após seu recebimento em plasmídeo de clonagem, o gene *HsGBA* foi inserido no plasmídeo pHsp70A/RbcS2-cgLuc por restrição com endonucleases e ligação. Esse vetor foi combinado com o plasmídeo pKS-aph7⁻-lox para a transferência do cassete de expressão do gene de interesse por recombinação sítio específica mediada pelo sistema Cre/lox, originando o vetor pKS-aph7⁻-lox::HsGBA, que contém, assim, os cassetes de expressão em *tandem* para *HsGBA* e para o marcador de seleção aph7⁻, codificador da enzima aminoglicosídeo fosfotransferase e capaz de conferir resistência à higromicina B. A linhagem de *C. reinhardtii* CC-400 cw15 mt⁺ foi transformada por eletroporação com o plasmídeo resultante linearizado (clivado com EcoRV) e na forma circular. A integração de *HsGBA* no genoma de cinco linhagens de *C. reinhardtii* foi comprovada por PCR e sua expressão foi demonstrada em três dessas linhagens de forma qualitativa por RT-PCR. Como *HsGBA* é controlado por um promotor induzível, *hsp70A*, diversas condições foram testadas visando à sua máxima expressão. Entretanto, análises por SDS-PAGE e *western blot* não permitiram a detecção da proteína recombinante. De modo semelhante, a atividade enzimática da HsGBA avaliada em extratos proteicos de linhagens transformadas não foi diferente da observada para linhagens não transformadas de *C. reinhardtii*.

Abstract

Considered the most common lysosomal disorder, Gaucher disease is caused by mutations in *GBA1* gene that result in defective synthesis of the enzyme glucocerebrosidase (GBA), responsible for the hydrolysis of glucocerebrosides into glucose and ceramide. When the enzyme is defective, these glycolipids accumulate in the macrophages, mainly in the liver, spleen and bone marrow, leading to a complex phenotype. Current treatment consists of enzyme replacement therapy by the administration of exogenous human GBA (HsGBA) and, in spite of its efficacy, it is exceptionally expensive. As other species of microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii* has a high potential for production of large amounts of recombinant proteins rapidly and at a much lower cost than traditional expression systems. In the present work we proposed the expression of the *HsGBA* gene from the nuclear genome of *C. reinhardtii* aiming the production of the protein as a possible alternative to enzyme replacement therapy. The artificial *HsGBA* gene, adapted to the nuclear codon usage of *C. reinhardtii*, was designed with restriction sites and synthesized by GenScript USA Inc. The nucleotide sequence was provided in a cloning vector and the *HsGBA* gene was inserted into the plasmid pHsp70A/RbcS2-*cgLuc* by endonuclease digestion and ligation. The resulting vector was fused to the plasmid pKS-*aph7*⁻-*lox* for transferring of the expression cassette of the gene of interest by site-specific recombination mediated by the Cre/*lox* system, yielding the plasmid pKS-*aph7*⁻-*lox*::*HsGBA*. As a result, this tandem vector has the expression cassettes for *HsGBA* and for the selection marker *aph7*⁻, which encodes the aminoglycoside phosphotransferase enzyme that confers resistance to hygromycin B. The *C. reinhardtii* strain CC-400 cw15 mt⁺ was transformed by electroporation with the resulting plasmid, in the supercoiled and linear (digested with EcoRV) forms. The *HsGBA* integration into the genome of five strains of *C. reinhardtii* was confirmed by PCR and their expression was demonstrated qualitatively in three of these strains by RT-PCR. As the *HsGBA* gene is under the control of the inducible promoter *hsp70A*, several conditions were tested aiming its higher expression. However, the protein could not be detected by SDS-PAGE and western blot. Likewise, the enzymatic activity of the HsGBA was measured in protein extracts of the transgenic strains but did not differ from the control.

1. Introdução

1.1 Glicocerebrosidase

A glicocerebrosidase humana (HsGBA) é uma entre as mais de cem hidrolases lisossomais, enzimas envolvidas na degradação dos resíduos resultantes de processos fagocíticos que ocorrem em condições ácidas no interior dos lisossomos (Mullin e Schapira, 2015). Mais especificamente, a HsGBA ou β -glicosidase ácida (D-glicosil-N-acilesfingosina glico-hidrolase, EC 3.2.1.45) é uma enzima associada à membrana dos lisossomos onde é responsável pelo catabolismo de glicocerebrosídeos, glicolipídios originados de membranas de células senescentes, principalmente as sanguíneas, que são fagocitadas por macrófagos.

Os glicocerebrosídeos são compostos por uma molécula de glicose unida por uma ligação glicosídica a uma molécula de ceramida, estrutura formada pelo aminoálcool esfingosina unido por uma ligação amida a um ácido graxo de cadeia longa, com 16 a 24 átomos de carbono, conforme ilustrado na Figura 1 (Grabowski *et al.*, 1998).

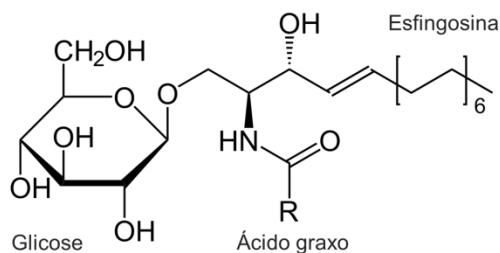


Figura 1: Estrutura do glicocerebrosídeo. O glicocerebrosídeo, ou glicosilceramida, é composto por uma molécula de glicose unida por uma ligação glicosídica a uma molécula de ceramida. A ceramida é formada pela esfingosina (2-amino-4-octadeceno-1,3-diol), um aminoálcool com 18 átomos de carbono, unida mediante ligação amida a um ácido graxo de cadeia longa (R) que pode ter de 16 a 24 átomos de carbono [adaptado de Grabowski, Leslie e Wenstrup (1998)].

A enzima HsGBA é codificada pelo gene *GBAI*, localizado na região 21q do cromossomo 1. Com 7,6 kb, o gene *GBAI* possui 11 éxons e 10 íntrons e resulta em um transcrito com 2 potenciais códons de início de tradução em seu longo quadro aberto de leitura. O início da tradução a partir do primeiro códon resulta em uma proteína com um peptídeo-sinal de 39 aminoácidos. Por outro lado, quando a tradução tem início no segundo códon, o peptídeo-sinal da proteína resultante contém 19 aminoácidos (Sorge *et al.*, 1985; Sorge *et al.*, 1987; Horowitz *et al.*, 1989). Independentemente de seu tamanho, o peptídeo-sinal é clivado durante o transporte da proteína através da membrana do retículo endoplasmático, originando um monômero de 497 aminoácidos com massa molecular entre 59 e 69 kDa, conforme o padrão de glicosilação que pode ocorrer em 5 potenciais sítios. Normalmente, os primeiros quatro sítios de *N*-glicosilação preditos estão ocupados, e para o desenvolvimento de um conformero cataliticamente ativo, a glicosilação no primeiro sítio é essencial. A enzima possui ainda três pontes dissulfeto, que também são essenciais para sua atividade (Grabowski *et al.*, 1998).

Ao contrário da maior parte das proteínas lisossomais, que são direcionadas aos lisossomos por interação com receptores de manose-6-fosfato, o transporte da HsGBA do seu local de síntese, no retículo endoplasmático, aos lisossomos é mediado pela interação da enzima com a proteína integral da membrana lisossomal do tipo 2 (LIMP-2) (Reczek *et al.*, 2007; Liou *et al.*, 2014; Blanz *et al.*, 2015). Durante esse transporte, é fundamental a passagem da proteína pelo complexo de Golgi para a adição de oligossacarídeos. Também ao contrário do que ocorre com a maioria das outras proteínas lisossomais solúveis, a HsGBA não é secretada em quantidades significativas (Grabowski, 2012).

Conquanto a HsGBA esteja presente em todas as células nucleadas, o catabolismo dos glicocerebrosídeos ocorre especificamente em macrófagos no baço, no fígado e na medula óssea, onde a HsGBA hidrolisa a ligação glicosídica entre glicose e ceramida (Figura 2). Para que essa reação aconteça, a enzima requer interações com fosfolipídios além de uma proteína ativadora, a saposina C (Grabowski *et al.*, 1998; Grabowski, 2012).

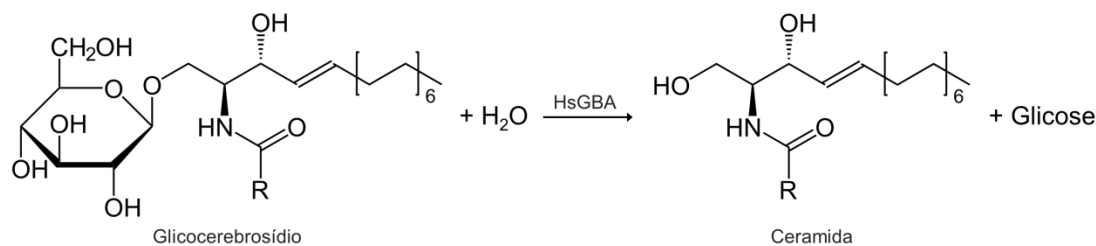


Figura 2: Hidrólise do glicocerebroside catalisada pela enzima HsGBA, com a formação de glicose e ceramida [adaptado de Brady (1997)].

Quando a enzima é inativa ou pouco funcional, a hidrólise da ligação glicosídica não ocorre e, sem a liberação da molécula de glicose, os glicocerebroside e os outros glicosfingolipídios, que não podem ser excretados ou reutilizados, acumulam-se, sendo armazenados nos lisossomos dos macrófagos e de outras células do sistema fagocitário onde prejudicam funções celulares básicas como rotas oxidativas, vias de sinalização e tráfego intracelular. Em longo prazo, o depósito dessas células com acúmulo de glicocerebroside em órgãos com alta concentração de macrófagos como baço, fígado e medula óssea leva a uma série de manifestações clínicas, características da doença de Gaucher (Mankin, 1993; Motta *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm investigado a relação entre a atividade da enzima HsGBA e a patogênese da doença de Parkinson (Alcalay *et al.*, 2015). Esses estudos demonstraram uma redução na atividade da HsGBA no cérebro de pacientes com mal de Parkinson em comparação com o de controles saudáveis e indicaram que mutações no gene *GBA1* representam o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da doença de Parkinson identificado até o momento. Estima-se que mutações em *GBA1* aumentem aproximadamente 20 vezes o risco para a doença de Parkinson, tanto em indivíduos homocigotos como em heterocigotos (Schapira, 2015). Além disso, evidências apontam que um declínio na atividade da HsGBA relacionado ao envelhecimento também pode atuar como um fator de risco para o desenvolvimento da doença, independentemente da presença de mutações em *GBA1* (Rocha *et al.*, 2015). Apesar do forte vínculo entre a enzima HsGBA e a doença de Parkinson, o exato mecanismo des'sa associação ainda não está elucidado. No entanto, parece haver uma relação recíproca entre os níveis de HsGBA e os de α -sinucleína, cuja degradação é influenciada pela enzima em condições fisiológicas. Em situações com baixa atividade

da HsGBA, como ocorre em consequência de mutações em *GBAI*, a degradação de α -sinucleína nos lisossomos é comprometida, havendo seu acúmulo e agregação, resultando em neurotoxicidade. Em contrapartida, a agregação de α -sinucleína inibe a atividade da HsGBA no cérebro de pacientes com doença de Parkinson mesmo sem mutações em *GBAI*, formando, assim, um círculo vicioso (Brockmann e Berg, 2014; Schapira, 2015).

1. 2 Doença de Gaucher

Considerada a mais comum das doenças lisossômicas humanas, a doença de Gaucher é causada por mutações no gene *GBAI*. Essas mutações, que podem ser pontuais, inserções, deleções ou rearranjos, levam à síntese defeituosa da enzima HsGBA, resultando na redução ou na ausência de sua função no lisossomo, o que provoca o acúmulo de glicocerebrosídeos responsável pelas manifestações clínicas da doença (Grabowski, 2012; Nagral, 2014). A ausência da enzima é letal, levando à morte no período pré ou neonatal. Sendo assim, para todos os pacientes portadores da doença de Gaucher, independentemente da gravidade, observa-se alguma atividade residual da HsGBA, a qual é inversamente proporcional à progressão da doença (Grabowski, 2012).

Descrita em 1882 por Philippe Gaucher, é uma doença autossômica recessiva que acomete aproximadamente 1 em cada 75 mil pessoas. Embora seja uma doença pan-étnica, ela é particularmente prevalente entre judeus asquenazes, podendo atingir 1 em cada 600 pessoas (Rosenbloom e Weinreb, 2013). Estima-se que 1 em cada 10 a 15 judeus asquenazes é portador de um alelo mutante de *GBAI* e, entre os mais de 350 alelos variantes associados à doença de Gaucher, somente 6 correspondem a 98 % das mutações encontradas nessa população (Orenstein *et al.*, 2014).

De acordo com a mutação no gene *GBAI*, além de outros fatores genéticos, epigenéticos e ambientais ainda não definidos, os pacientes com a doença de Gaucher podem ser assintomáticos ou apresentar uma combinação de sintomas que reduzem sua qualidade de vida como anormalidades hematológicas, especialmente anemia e trombocitopenia, hepatoesplenomegalia, comprometimento esquelético que pode resultar em crises dolorosas e em retardo do crescimento e, em casos mais graves, acometimento do sistema nervoso (Orenstein *et al.*, 2014). Além disso, existem relatos

associando a doença de Gaucher com alguns tipos de câncer, especialmente mieloma múltiplo, eventos cardiovasculares e cerebrovasculares, doença de Parkinson e redução na expectativa de vida (Zimran, 2011; Mistry *et al.*, 2015).

Os mecanismos responsáveis por essas manifestações ainda não são completamente compreendidos mas, além do acúmulo de glicocerebrosídeos em si, a ativação de macrófagos, processo relacionado à inflamação crônica, e a fibrose decorrente deste acúmulo, parecem ser vias importante na patofisiologia da doença de Gaucher. As citocinas secretadas pelos macrófagos ativados provocam uma estimulação crônica do sistema imunológico e poderiam ser responsáveis, por exemplo, pelo aumento da atividade osteoclástica que pode provocar osteopenia, osteonecrose e fraturas ósseas (Harmanci e Bayraktar, 2008; Mucci e Rozenfeld, 2015). Essas substâncias também parecem ter contribuição para a hepatoesplenomegalia, para a anemia, para a leucopenia e para a trombocitopenia características da doença (Huang *et al.*, 2015). Além desses processos, o enovelamento anormal de proteínas mutadas no retículo endoplasmático foi proposto como um mecanismo alternativo para ativação celular. Existem evidências sugerindo que algumas mutações provocariam um enovelamento anormal da proteína HsGBA, desencadeando uma resposta de proteína desenovelada que poderia acionar vias apoptóticas ou inflamatórias em vários tecidos (Grabowski, 2008). Esse mecanismo também pode estar envolvido na patogênese da doença de Parkinson (Huang *et al.*, 2015; Schapira, 2015). Nos casos em que há envolvimento neuronal, a glicosilfosfingosina, forma desacetilada da glicosilceramida, que também é substrato da HsGBA, acumula-se nas células do sistema nervoso central, podendo ser responsável pela morte dos neurônios (Huang *et al.*, 2015). A neurotoxicidade atribuída a esse lipídio pode ser decorrente de distúrbios na homeostasia do cálcio (Pelled *et al.*, 2005).

Apesar da variabilidade em relação aos sintomas apresentados, os pacientes com a doença de Gaucher têm sido convencionalmente divididos em três tipos clínicos com base na ausência (tipo 1) ou na presença de sinais neurológicos de início precoce (tipos 2 e 3) (Rosenbloom e Weinreb, 2013). A forma clínica mais frequente da doença de Gaucher, correspondente a 95 % dos casos, é o tipo 1, ou forma crônica não neuronopática do adulto. Os pacientes com essa forma da doença podem ser assintomáticos ou apresentar graus variados de hepatoesplenomegalia, manifestações hematológicas e envolvimento ósseo. Esses sintomas podem ter início em qualquer

idade e a sobrevida dos pacientes pode ser normal, dependendo da progressão da doença e da gravidade das complicações (Martins *et al.*, 2009). Apesar da ausência de comprometimento neurológico, estudos recentes têm relatado casos de neuropatia periférica e doença de Parkinson entre a sétima e a oitava década de vida (Baris *et al.*, 2014).

Os tipos 2 e 3 da doença de Gaucher são formas neuronopáticas que, além do comprometimento visceral, afetam o sistema nervoso central, manifestando-se com diferentes graus de deterioração neurológica. O tipo 2 ou forma neuronopática aguda ou, ainda, forma infantil neuronopática, manifesta-se com alterações neurológicas graves ainda no período pré-natal ou nos primeiros anos de vida, levando à morte, normalmente, antes dos três anos de idade. Por fim, o tipo 3, a forma neuronopática subaguda ou forma juvenil neuronopática, pode ter início em qualquer fase da infância e combina aspectos das duas formas anteriores, com disfunção neurológica lentamente progressiva. Os pacientes com essa forma da doença normalmente sobrevivem até a segunda ou terceira década de vida (Martins *et al.*, 2009; Rosenbloom e Weinreb, 2013; Huang *et al.*, 2015).

O tratamento da doença de Gaucher envolve medidas de suporte e terapia específica, que pode ser a inibição da síntese de substrato ou a terapia de reposição enzimática. Estas abordagens têm como objetivo prevenir o desenvolvimento de novas manifestações clínicas, principalmente aquelas irreversíveis, promovendo uma melhor qualidade de vida aos pacientes (Brasil, 2011). Na ausência de tratamento, o curso natural da doença de Gaucher, mesmo para o tipo 1, é extremamente desfavorável, evoluindo com frequentes complicações e altas taxas de morbidade e mortalidade (Martins *et al.*, 2009).

Os inibidores da síntese de substrato levam à redução da síntese de glicocerebrosídeos e de todos os glicoesfingolípídios derivados por inibirem a atividade da glicosilceramida sintase, enzima responsável pela conversão de ceramida em glicocerebrosídeo. Com a redução da concentração do substrato, mesmo uma atividade enzimática residual seria suficiente para evitar o acúmulo de glicocerebrosídeos nos lisossomos (Grabowski, 2008). Apesar da eficácia comprovada para essa opção terapêutica, as evidências disponíveis até o momento não demonstram superioridade dos inibidores da síntese de substrato em relação à terapia de reposição enzimática no

tratamento dos pacientes com a doença de Gaucher. Devido a isso e também aos substanciais efeitos adversos decorrentes do seu uso, os inibidores da síntese de substrato são atualmente indicados apenas aos pacientes que não toleram ou não aceitam a terapia de reposição enzimática (Shemesh *et al.*, 2015).

1. 3 Terapia de Reposição Enzimática

A terapia de reposição enzimática é a estratégia mais antiga e mais específica para o tratamento da doença de Gaucher e consiste na administração endovenosa de formas recombinantes da enzima HsGBA, normalmente, duas vezes ao mês. A reposição da enzima possibilita a conversão de seu substrato em glicose e ceramida, diminuindo o acúmulo de glicocerebrosídeos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de toda a cascata de eventos bioquímicos que acabam por ocasionar as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes (Brasil, 2011). De fato, a terapia de reposição enzimática tem se mostrado segura e eficaz na prevenção ou na reversão da hepatomegalia, da esplenomegalia, da citopenia e das manifestações ósseas (Motta *et al.*, 2016). Entretanto, como a enzima não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sua administração por via intravenosa não melhora os aspectos neurológicos da doença. Sendo assim, a terapia de reposição enzimática está indicada somente aos pacientes com doença de Gaucher do tipo 1 e para o tratamento dos sintomas não neurológicos em pacientes com o tipo 3. Atualmente, como não existe terapia específica para a doença de Gaucher do tipo 2, o tratamento dos pacientes com essa forma da doença envolve somente medidas paliativas (Zimran, 2011; Baris *et al.*, 2014).

O princípio da terapia de reposição enzimática baseia-se no direcionamento da enzima exógena aos lisossomos de macrófagos que estão em processo de acúmulo de glicocerebrosídeos. Para isso, a maior parte das formas recombinantes da enzima deve ser processada com glicosidases a fim de remover os resíduos externos de carboidratos, aumentando, assim, a exposição de resíduos de manose. Esse processo, caro e trabalhoso, permite, então, o direcionamento da enzima aos receptores endocíticos de manose dos macrófagos, lectinas presentes na superfície dessas células que interagem avidamente com glicoconjugados com manose terminal (Brady, 1997; Mor, 2015).

Quando o resíduo de manose da enzima liga-se ao receptor, o complexo enzima-receptor é endocitado formando endossomos no interior dos macrófagos. Esses endossomos fundem-se aos lisossomos, permitindo que a enzima recombinante e biologicamente ativa tenha acesso ao seu substrato, o que possibilita a hidrólise dos glicocerebrosídeos armazenados nos macrófagos (Phenix *et al.*, 2010).

A terapia de reposição enzimática teve início em 1991 com o desenvolvimento, pela empresa Genzyme, da alglucerase (Ceredase[®]), uma forma de glicocerebrosidase extraída de placentas humanas e posteriormente modificada para exposição de resíduos de manose. Na época, o custo anual do tratamento por paciente nos Estados Unidos variava entre US\$ 380 e 765 mil. Para o tratamento dos 15 mil pacientes norte-americanos, o custo chegava a US\$ 1 bilhão por ano e, com isso, a alglucerase passou a ser considerada pelos jornais *The New York Times* e *The Wall Street Journal* o medicamento mais caro do mundo (Beutler, 1992). Recentemente, em uma pesquisa publicada na *Nature Reviews Drug Discovery*, a alglucerase foi eleita por médicos como o fármaco mais transformador dos últimos 20 anos no campo da genética médica, não somente por ter possibilitado o tratamento dos pacientes com a doença de Gaucher mas, também, por ter servido de modelo para o tratamento, por reposição enzimática, de outras doenças genéticas consideradas até então fatais (Kesselheim e Avorn, 2013).

Em 1994, a mesma empresa passou a comercializar a imiglucerase (Cerezyme[®]), a HsGBA recombinante produzida em células de ovário de hamster chinês (CHO, do inglês, *Chinese hamster ovary*) e modificada para exposição de resíduos de manose (Rosenbloom e Weinreb, 2013). Mais segura que a alglucerase, a enzima recombinante não oferecia risco de transmissão de agentes infectantes como a enzima obtida de placentas. Porém, a versão recombinante não representava maior vantagem em termos de custo do tratamento, que ainda permanecia muito elevado (Schmitz *et al.*, 2007). No Brasil, por se tratar de um medicamento considerado essencial à melhoria da qualidade de vida dos portadores da doença de Gaucher, a imiglucerase foi incluída pelo Ministério da Saúde no rol dos Medicamentos Excepcionais do Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, 2002).

Em 2009, em razão da contaminação de biorreatores da *Genzyme* pelo vesivírus 2117, o qual afeta a multiplicação celular, ocorreu a suspensão temporária da produção mundial de imiglucerase (Opar, 2011). No ano seguinte, a consequente

incapacidade técnica de fornecimento da enzima desencadeou uma situação de emergência no Brasil e no mundo, levando à aquisição emergencial de alternativas terapêuticas pelo Ministério da Saúde a fim de evitar a interrupção do tratamento e suas potenciais consequências clínicas aos pacientes portadores da doença de Gaucher. As alternativas encontradas foram duas novas formas recombinantes de HsGBA ainda em ensaios clínicos na época: a velaglucerase alfa, produzida em linhagem de fibroblastos humanos pela Shire Human Genetic Therapies, aprovada para uso em diversos países no ano seguinte, e a alfataliglicerase, produzida em células transformadas de raiz de cenoura pela Protalix Biotherapeutics (Brasil, 2010; Zimran, 2011). A alfataliglicerase (Uplyso[®]) foi a primeira proteína humana produzida em plantas aprovada pela agência norte-americana *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para fins terapêuticos e sua plataforma de produção representou um marco para o desenvolvimento de outros biofármacos a partir de células vegetais (Opar, 2011; Mor, 2015).

Para permitir a eficiente expressão da proteína ativa em células de cenoura, foram realizadas algumas alterações na sequência nativa do gene *GBA1*, como a substituição da região codificadora de seu peptídeo-sinal pelo do gene que codifica a endoquitinase básica em *Arabidopsis thaliana*, visando a translocação cotraducional para o retículo endoplasmático. Além desta modificação, a sequência sinal DLLVDTM da quitinase A de tabaco, que direciona a proteína para armazenamento nos vacúolos via retículo endoplasmático, foi adicionada à extremidade C-terminal de HsGBA (Shaaltiel *et al.*, 2007). Em consequência dessas modificações, a alfataliglicerase difere da HsGBA por dois aminoácidos na porção N-terminal, sete aminoácidos na porção C-terminal e, assim como na imiglucerase, a arginina na posição 495 é substituída por um resíduo de histidina (Grabowski *et al.*, 2014).

O endereçamento da proteína para os vacúolos teve como objetivo o seu armazenamento em uma organela com baixos níveis de proteases e na qual, conforme indicado por alguns estudos, enzimas vacuolares especiais poderiam modificar carboidratos complexos, resultando na exposição de resíduos de manose. Como resultado, a alfataliglicerase contém naturalmente oligossacarídeos terminados em manose, essenciais para o seu direcionamento aos macrófagos, não requerendo o tratamento *in vitro* com glicosidases necessário para a enzima obtida a partir de células animais (Shaaltiel *et al.*, 2007).

Além do padrão de glicosilação, outra grande vantagem da alfataliglicerase está relacionada à sua plataforma de produção, um sistema de alto rendimento baseado na suspensão de células transgênicas de cenoura que pode ser facilmente ampliado em biorreatores descartáveis, sem o risco de contaminação por patógenos que infectam células animais, o que proporciona segurança e redução de custos (Zimran, 2011). Representando 75 % do custo do tratamento com a imiglucerase, o uso da alfataliglicerase foi aprovado nos Estados Unidos em 2012 (Maxmen, 2012). No Brasil, apesar de ser utilizada desde 2010, a alfataliglicerase foi registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde somente em 2013, sendo incorporada como terapia de reposição enzimática de primeira escolha para o tratamento de novos casos de doença de Gaucher no âmbito do SUS em 2014 (Brasil, 2014a).

Embora produzidas em diferentes sistemas de expressão e com diferentes estratégias para exposição dos resíduos de manose, parece que a diferença entre as três formas recombinantes da HsGBA atualmente disponíveis para terapia de reposição enzimática consiste basicamente no padrão de glicosilação de cada uma delas. No entanto, essa diferença não altera significativamente as propriedades das enzimas, as quais apresentam perfis similares de eficácia e segurança no tratamento dos pacientes com a doença de Gaucher (Grabowski *et al.*, 2014). Recentemente, em uma revisão baseada em estudos randomizados controlados, Shemesh *et al.* (2015) concluíram que, não havendo evidências que demonstrem a superioridade de uma enzima em relação às outras, a escolha da terapia deve ser embasada em considerações não médicas, incluindo o custo do tratamento que, independentemente da forma recombinante eleita, é extremamente elevado e praticamente insustentável por qualquer paciente (Nagral, 2014).

No Brasil, onde o tratamento é garantido por lei, dos 643 pacientes com doença de Gaucher tratados no SUS em 2013, 618 receberam terapia de reposição enzimática com imiglucerase ou alfataliglicerase. Considerando a dose média de 30 U/kg/infusão, a cada 15 dias (24 infusões anuais), cada paciente, pesando em média 70 kg, teria recebido 50.400 U de enzima ao longo do ano. Desta forma, cada paciente teria gasto, em média, no ano de 2013, R\$ 182.946,96 com o uso da imiglucerase e R\$ 216.095,04 com o uso da alfataliglicerase, totalizando um custo estimado de mais de R\$ 114 milhões para o Ministério da Saúde (Tabela 1). O maior custo por unidade observado para a alfataliglicerase foi justificado pela importação da enzima, que até 2017 deverá ser produzida no Brasil. Para a estimativa do valor gasto em reais, foi utilizada a média

da taxa de câmbio do dólar americano em 2013, considerando que 1 US\$ correspondia a R\$ 2,16 (Brasil, 2014b).

Tabela 1: Estimativa do valor gasto por paciente com terapia de reposição enzimática no SUS em 2013.

Medicamento	Nº de pacientes tratados	Custo de 1 U (R\$)	Custo por paciente (50.400 U/ano) (R\$)	Custo total para o SUS (R\$)
Imiglucerase	579	3,63	182.946,96	105.926.289,84
Alfataliglicerase	39	4,29	216.095,04	8.427.706,56
	618			114.353.996,40

Fonte: Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (Brasil, 2014b)

No entanto, o valor estimado da terapia de reposição enzimática em outros países é ainda maior, o que pode impossibilitar o acesso dos pacientes ao tratamento, especialmente em regiões com recursos mais limitados. Segundo Essabar *et al.* (2015), o custo anual por paciente no Marrocos, por exemplo, pode chegar a US\$ 300 mil, limitando o tratamento da doença a medidas paliativas, como o uso de analgésicos e transfusões sanguíneas. Na Índia, por outro lado, o tratamento dos pacientes com a doença de Gaucher é subsidiado por programas mantidos principalmente pelas indústrias farmacêuticas fabricantes das enzimas (Nagral, 2014).

Assim, diante do alto custo do tratamento, o desenvolvimento de novas estratégias para a produção da HsGBA que resultem em alternativas mais econômicas poderia tornar mais acessível a terapia de reposição enzimática (Novo *et al.*, 2012). Novo *et al.* (2012), por exemplo, propuseram um sistema diferente para a obtenção da enzima, a um menor custo, em células CHO. Porém, diversos outros trabalhos exploram a produção da HsGBA a partir de células vegetais, como em folhas (Cramer *et al.*, 1996) e sementes (Reggi *et al.*, 2005) de *Nicotiana tabacum*, em sementes de *A. thaliana* (He *et al.*, 2012) e, mais recentemente, em folhas de *Nicotiana benthamiana* (Limkul *et al.*, 2015). Por fim, a estratégia mais inovadora consiste na administração, por via oral, da HsGBA recombinante encapsulada em células de cenoura. Shaaltiel *et al.* (2015) demonstraram a viabilidade desse sistema, no qual a parede celular da célula vegetal protege a proteína recombinante do suco gástrico e permite sua absorção no intestino.

Apesar de uma aparente tendência no uso de sistemas vegetais para a produção da HsGBA recombinante, todos os trabalhos publicados recentemente são baseados em células de plantas, não havendo, até o momento, relatos da obtenção da enzima a partir de células de algas, uma potencial plataforma para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacológico (Gong *et al.*, 2011; Rasala e Mayfield, 2015).

1. 4 Organismos para a produção de proteínas recombinantes

Durante os últimos 40 anos, o desenvolvimento da biotecnologia e da engenharia genética tem possibilitado o uso de organismos geneticamente modificados para a produção de proteínas recombinantes e de pequenas moléculas (Rasala e Mayfield, 2015). Essas proteínas oferecem um grande potencial como agentes terapêuticos para o tratamento de uma série de condições como, por exemplo, as decorrentes de doenças crônicas, provocadas por agentes infecciosos ou relacionadas a câncer. Principalmente em razão da alta sensibilidade e da especificidade dessas moléculas, opções terapêuticas baseadas em proteínas representam o setor de maior crescimento no desenvolvimento de novos fármacos. O avanço em técnicas de genômica e proteômica e a compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento e no desenvolvimento de muitas doenças nos níveis celular e molecular tem permitido a rápida identificação de proteínas capazes de desempenhar funções terapêuticas. A possibilidade de emprego farmacológico dessas proteínas aumenta ainda mais à medida que técnicas de produção mais sofisticadas são desenvolvidas (Fletcher *et al.*, 2007; Mayfield *et al.*, 2007).

No entanto, a complexidade inerente às estruturas moleculares das proteínas restringe sua síntese a células vivas, o que torna onerosa sua produção. Além do alto custo envolvido, a grande quantidade de proteínas necessária para o tratamento de determinadas doenças e a carência de sistemas de produção eficientes representam as principais limitações na produção de proteínas terapêuticas. Desta forma, o desenvolvimento de sistemas alternativos, capazes de superar os desafios existentes tende a viabilizar o emprego de diversas proteínas recombinantes como agentes terapêuticos, de aplicação industrial e para fins de pesquisa (Fletcher *et al.*, 2007; Mayfield *et al.*, 2007). A produção de proteínas recombinantes é um mercado crescente

que, segundo estimativas, atingiu aproximadamente US\$ 5 bilhões em 2009. Esse valor refere-se somente ao setor de enzimas para fins industriais, uma vez que o mercado de proteínas terapêuticas, naquele mesmo ano, foi avaliado em US\$ 99 bilhões (Rasala e Mayfield, 2015).

Atualmente, proteínas recombinantes são produzidas em diversos organismos incluindo desde bactérias, leveduras, culturas celulares de insetos, mamíferos e de diversas espécies vegetais, até animais transgênicos. Como demonstrado na Tabela 2, cada um desses organismos possui suas vantagens e suas limitações em relação ao tipo e à quantidade de proteína que pode ser sintetizada, à facilidade de manipulação e aos custos de produção (Rasala e Mayfield, 2015).

Tabela 2: Comparação entre diferentes organismos de produção de proteínas recombinantes atualmente disponíveis [modificado de Walker et al. (2005) e Potvin e Zhang (2010)].

Características	Bactérias	Leveduras	Células animais ^a	Animais	Plantas	Microalgas
Tempo de produção	Curto	Médio	Longo	Longo	Longo	Curto
Custo de cultivo	Médio	Médio	Elevado	Elevado	Baixo	Muito baixo
Custo de ampliação do cultivo	Elevado ^b	Elevado ^b	Elevado ^b	Elevado ^b	Baixo	Muito baixo
Tamanho máximo do transgene	?	?	Limitado	Limitado	Ilimitado	Ilimitado
Glicosilação	Ausente	Incorreta	Correta	Correta	Correta ^c	Correta ^c
Rendimento de proteína	Médio	Elevado	Médio a elevado	Elevado	Elevado	Normalmente baixo

^a Refere-se à produção em cultura de células animais.

^b Em relação a fermentadores de larga escala e equipamentos associados.

^c Apenas para proteínas produzidas a partir do genoma nuclear; ausente em cloroplastos.

Plataformas de produção de proteínas recombinantes baseadas em bactérias e leveduras são consideradas especialmente interessantes para a síntese de enzimas com finalidade industrial por serem mais bem caracterizadas, pela facilidade de manipulação do genoma e pela simplicidade de cultivo desses micro-organismos e em função do menor custo envolvido. Sistemas bacterianos, principalmente empregando *Escherichia coli*, são muito utilizados para a produção de proteínas menores e estruturalmente simples pois, como procaríotos, bactérias normalmente não realizam modificações pós-

traducionais como a formação de pontes dissulfeto, a fosforilação e a glicosilação, além de serem ineficientes no enovelamento e na secreção de proteínas. Ademais, proteínas complexas frequentemente acumulam-se em corpos de inclusão insolúveis, requerendo etapas adicionais de processamento que agregam custo à produção. Por outro lado, a utilização de leveduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, combina as vantagens de sistemas eucarióticos como a capacidade de enovelamento de proteínas complexas e a realização de modificações pós-traducionais, com a alta produtividade e menores custos de produção, comparáveis a sistemas procarióticos, resultando em maiores rendimentos. Entretanto, *S. cerevisiae* tende a hiperglicosilar proteínas recombinantes, tornando-as imunogênicas em humanos (Potvin e Zhang, 2010; Rasala e Mayfield, 2015).

Diante disso, linhagens celulares de mamíferos, como células CHO, representam, atualmente, a plataforma preferida para a produção de proteínas terapêuticas maiores e mais complexas e para as que requerem modificações pós-traducionais. Porém, em função do alto investimento necessário para assegurar a assepsia das culturas, dos custos com meios de cultura complexos, do baixo rendimento obtido para algumas proteínas, da instabilidade das linhagens celulares e da inerente complexidade destes sistemas de produção, o valor das proteínas recombinantes obtidas dessa maneira é extremamente elevado, podendo variar de US\$ 150 a US\$ 1.000 por grama de proteína antes da purificação (Griesbeck *et al.*, 2006; Fletcher *et al.*, 2007; Potvin e Zhang, 2010; Lauersen *et al.*, 2013). Além disso, o padrão de glicosilação do tipo murino, obtido a partir dessas células, pode ser altamente imunogênico em humanos e pode influenciar a farmacocinética da proteína, acelerando sua eliminação. Para contornar esse problema, linhagens celulares humanas também estão sendo desenvolvidas para a produção de proteínas recombinantes (Rasala e Mayfield, 2015). Por fim, o risco de contaminação da proteína isolada com agentes potencialmente patogênicos como vírus e príons ou sequências oncogênicas é considerado uma das principais desvantagens da cultura de células de mamíferos (Walker *et al.*, 2005; Griesbeck *et al.*, 2006).

O isolamento de proteínas recombinantes complexas a partir do leite de animais transgênicos tem ganhado especial atenção nos últimos anos como um potencial sistema de produção. Contudo, enquanto o processo de produção pode ser fácil e barato após o estabelecimento do rebanho transgênico, a geração e a multiplicação desses

animais são etapas extremamente demoradas e onerosas, podendo custar até US\$ 500 mil por animal (Walker *et al.*, 2005; Griesbeck *et al.*, 2006).

Além desses organismos e linhagens celulares, diversos grupos têm investido na exploração da produtividade de plantas terrestres para a síntese de proteínas recombinantes de interesse farmacológico. Uma variedade de proteínas heterólogas com potencial terapêutico tem sido obtida a partir de plantas incluindo, por exemplo, anticorpos funcionais, vacinas, enzimas e hormônios. O custo de produção dessas moléculas em células fotossintetizadoras é muito menor que o observado em sistemas celulares que empregam fermentadores, o que torna as plantas uma plataforma atrativa e uma alternativa econômica interessante para a produção de proteínas recombinantes complexas (Fletcher *et al.*, 2007; Specht *et al.*, 2010). Entre outras vantagens proporcionadas pela utilização de plantas transgênicas destacam-se, ainda, a facilidade com que a produção pode ser ampliada por meio de métodos agrônômicos convencionais e a inexistência do risco de contaminação por patógenos humanos a que estão vulneráveis os outros sistemas animais de produção, especialmente mamíferos (Walker *et al.*, 2005; Griesbeck *et al.*, 2006).

Apesar da capacidade de realizar modificações pós-traducionais como as demais células eucarióticas, o padrão de glicosilação de plantas difere, no entanto, do observado em mamíferos, o que pode alterar as características da proteína recombinante e, inclusive, torná-la imunogênica ou ineficaz. Além disso, o longo tempo entre as etapas iniciais de transformação até o primeiro isolamento de proteínas, a dificuldade de purificação das proteínas de interesse a partir de tecidos vegetais com a possibilidade de contaminação do produto final com micotoxinas, defensivos agrícolas e metabólitos secundários, e o potencial risco de disseminação das plantas por meio do pólen transgênico estão entre os pontos críticos que vêm retardando o sucesso econômico dessa potencial plataforma até o momento (Walker *et al.*, 2005; Rosales-Mendoza *et al.*, 2012).

1.5 Microalgas como plataforma de produção de proteínas recombinantes

Algas são organismos eucarióticos fotossintetizadores que, ao contrário das plantas superiores, não possuem raízes, folhas e outros órgãos e tecidos característicos.

As algas, porém, possuem o pigmento clorofila, responsável por sua coloração verde, e os mesmos mecanismos fotossintetizadores básicos das plantas terrestres, embora executem esse processo com maior eficiência. As algas verdes formam um grupo heterogêneo que compreende mais de 8 mil espécies e podem ser unicelulares, no caso das microalgas, ou multicelulares, como é o caso das macroalgas. Podem, ainda, ser flageladas ou não, e viver em água doce ou no ambiente marinho, sendo responsáveis pela produção da metade do oxigênio atmosférico do planeta (Tran *et al.*, 2013; Gangl *et al.*, 2015; Rasala e Mayfield, 2015).

Embora as microalgas sejam utilizadas há séculos por diversos povos, seu cultivo em massa teve início logo após a Segunda Guerra Mundial nos Estados Unidos, na Alemanha e no Japão como uma potencial fonte de alimento diante da expansão demográfica da época (Potvin e Zhang, 2010). A partir de então, o cultivo de várias espécies de microalgas tem sido empregado para as mais diversas finalidades, desde o tratamento de efluentes, do controle de poluição de águas, da atenuação de gases responsáveis pelo efeito estufa, até a regeneração atmosférica em veículos espaciais (Walker *et al.*, 2005; Almaraz-Delgado *et al.*, 2014). Além disso, microalgas representam importantes fontes de nutracêuticos, aditivos alimentares, ácidos graxos, pigmentos, corantes, compostos com atividade antitumoral, antiviral e antifúngica, entre outras substâncias de interesse farmacêutico para uso em medicamentos e cosméticos e de combustíveis renováveis, como biodiesel e bio-hidrogênio (Gong *et al.*, 2011; Almaraz-Delgado *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2015). Recentemente, microalgas transgênicas têm atraído especial atenção como possíveis sistemas de produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico e biotecnológico (Rasala e Mayfield, 2015).

As microalgas oferecem as mesmas vantagens das plantas transgênicas, como a capacidade de sintetizar proteínas complexas, já que possuem chaperonas e a maquinaria celular necessária para seu enovelamento, combinadas com características especiais de micro-organismos, como a rápida multiplicação e a facilidade de cultivo (Specht *et al.*, 2010; Wijffels *et al.*, 2013). Em função do curto tempo de geração (aproximadamente 8 h) e da possibilidade de atingir alta densidade celular em biorreatores iluminados (superior a 10^7 células/mL), o potencial de produção de biomassa é muito superior ao das plantas. Além disso, por possuírem morfologia simples e sem estruturas diferenciadas, praticamente toda a energia é direcionada à fotossíntese e à multiplicação celular, resultando em altos níveis de proteínas que

correspondem entre 30 a 50 % da biomassa seca (Walker *et al.*, 2005; Rasala e Mayfield, 2011). Também em consequência da rápida multiplicação, o tempo desde a transformação inicial até a extração da proteína de interesse, assim como o tempo necessário para expansão do cultivo, é significativamente menor em comparação ao necessário nos sistemas baseados em plantas transgênicas (Corchero *et al.*, 2013; Gangl *et al.*, 2015).

Por serem micro-organismos fotossintetizadores, as microalgas requerem apenas luz, dióxido de carbono, água e alguns nutrientes simples para seu desenvolvimento. Assim, os meios para o cultivo fotoautotrófico são muito mais simples que os necessários em outros sistemas de produção, especialmente os que envolvem culturas de células animais, contribuindo bastante para a redução de custos (Potvin e Zhang, 2010). Além do mais, a ausência de fontes de carbono reduzido no meio de cultura diminui o risco de contaminação por bactérias e fungos, simplificando o processo de produção. Porém, muitas espécies de microalgas também podem se desenvolver de forma heterotrófica, sem a necessidade de luz, em meios de cultura contendo fontes de carbono como acetato, por exemplo (Rasala e Mayfield, 2015).

A segurança é outra vantagem proporcionada pelos sistemas de produção baseados em microalgas. Muitas espécies de algas não contêm toxinas e praticamente não são suscetíveis à contaminação por patógenos humanos como vírus ou príons, sendo consideradas seguras para o consumo animal e humano (Specht *et al.*, 2010). Desta maneira, as etapas de purificação das proteínas recombinantes são reduzidas, podendo até mesmo ser eliminadas, como no caso de proteínas terapêuticas administradas pela via oral, na forma de suspensão de células íntegras (Gong *et al.*, 2011). A simplificação das etapas de processamento contribui drasticamente para redução de custos que podem representar até 80 % do custo total da produção de proteínas em plataformas convencionais (Rasala e Mayfield, 2015). No entanto, quando necessária, a purificação de proteínas a partir de biomassa de algas é um processo muito mais fácil que os métodos aplicados a plantas, principalmente em função da estrutura simples das microalgas e da uniformidade da cultura. Além disso, algumas espécies de microalgas podem secretar a proteína sintetizada no meio de cultivo, simplificando ainda mais seu isolamento e reduzindo os custos de produção (Fletcher *et al.*, 2007).

Sendo assim, embora ainda não existam no mercado proteínas recombinantes produzidas em microalgas, esse sistema oferece um potencial de produção com alto rendimento, de forma muito mais rápida e a um custo muito inferior ao obtido com sistemas empregando culturas celulares tradicionais ou organismos animais e vegetais completos (Mayfield *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2011; Rasala e Mayfield, 2015). De acordo com estudos baseados na síntese de anticorpos recombinantes, o custo de produção por grama da proteína funcional foi estimado em US\$ 150 para sistemas empregando culturas celulares de mamíferos, US\$ 0,05 para plataformas baseadas em plantas transgênicas e apenas US\$ 0,002 com a utilização de microalgas, comprovando que este último sistema é o mais atrativo também do ponto de vista econômico (Corchero *et al.*, 2013).

Por fim, ao contrário do que pode ocorrer com plantas transgênicas, o cultivo de microalgas realizado em biorreatores fechados, além de reduzir o risco de contaminação da cultura por substâncias e patógenos presentes no ambiente, praticamente elimina o risco de contaminação ambiental com o micro-organismo geneticamente modificado e a preocupação com a possível transferência do transgene para outros organismos (Gangl *et al.*, 2015). Mesmo havendo uma contaminação acidental, a propagação das microalgas transgênicas é improvável, uma vez que as linhagens utilizadas normalmente contêm diversas mutações que limitam sua sobrevivência em condições naturais (Wijffels *et al.*, 2013).

Tendo em vista esses potenciais benefícios, nos últimos 20 anos houve um progresso significativo no desenvolvimento de tecnologias para a manipulação genética de diversas espécies de microalgas. Diversos grupos têm utilizado estas novas ferramentas para modificar vias metabólicas ou sintetizar proteínas recombinantes de alto valor como anticorpos, vacinas, fatores de crescimento e enzimas, por exemplo. Estudos recentes vêm comprovando a capacidade das microalgas de sintetizar, enovelar, realizar modificações pós-traducionais e secretar proteínas complexas tanto de animais como de diversos outros organismos eucarióticos. Ademais, resultados promissores tem apoiado a contínua pesquisa para o desenvolvimento de novas proteínas terapêuticas a partir de microalgas visando oferecer novas opções terapêuticas principalmente para doenças cujos tratamentos são excepcionalmente onerosos ou para as quais não existe tratamento disponível em função do seu alto custo de produção nos sistemas convencionais (Gangl *et al.*, 2015; Rasala e Mayfield, 2015).

1. 6 *Chlamydomonas reinhardtii*

Entre as microalgas, *Chlamydomonas reinhardtii* foi a primeira espécie a ser transformada geneticamente, sendo a mais estudada até o momento (Bertalan *et al.*, 2015). Pertencente ao filo Chlorophyta, *C. reinhardtii* é uma espécie de alga verde unicelular, da ordem Volvocales, família Chlamydomonadaceae (Pröschold *et al.*, 2001), considerada por alguns autores uma “levedura verde” (Wu *et al.*, 2008). Além da compartimentalização eucariótica típica, células selvagens apresentam dois flagelos apicais ancorados em corpos basais, um único cloroplasto que pode ocupar até 70 % do volume celular, um pirenoide, um estigma e uma parede celular composta principalmente por glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. Embora *C. reinhardtii* seja uma espécie de água doce, outras espécies do gênero são de distribuição universal, tendo sido isoladas nos mais diversos habitats, das zonas polares às de clima tropical, tanto em solos quanto em água doce e no ambiente marinho (Mussgnug, 2015; Rasala e Mayfield, 2015).

Por representar um ancestral comum entre plantas e animais, possuindo genes característicos desses dois reinos, *C. reinhardtii* constitui uma excelente plataforma microbiana para a investigação de funções biológicas fundamentais, associadas tanto a células vegetais como, por exemplo, mecanismos fotossintetizadores, quanto a células animais como, por exemplo, as ciliopatias humanas (Merchant *et al.*, 2007; Blaby *et al.*, 2014). Entre outros processos genéticos e metabólicos que têm se baseado em *C. reinhardtii* como um organismo modelo destacam-se a respiração, a organização e a função dos flagelos e dos corpos basais, o ciclo de vida e o acasalamento, o metabolismo do carbono, o transporte de nutrientes via membranas, o ciclo circadiano, o mecanismo de fotorreceptores e a adaptação à luz, a produção de hidrogênio e a produção de proteínas recombinantes (Mussgnug, 2015).

Atualmente, *C. reinhardtii* representa uma potencial e promissora plataforma para a produção comercial de proteínas recombinantes por apresentar todas as vantagens proporcionadas pelas microalgas em relação aos sistemas convencionais. Além disso, durante os últimos 25 anos, um vasto conjunto de ferramentas de genética molecular vem sendo desenvolvido para essa espécie, incluindo o sequenciamento completo do genoma, o estabelecimento de métodos de transformação eficientes, de promotores e de

marcadores de seleção e a projeção de vetores para o acúmulo e a secreção de altos níveis de proteínas heterólogas (Rasala e Mayfield, 2015).

Além do genoma nuclear, também existem métodos bem estabelecidos para a transformação dos genomas mitocondrial e do cloroplasto de *C. reinhardtii*, todos completamente sequenciados e disponíveis em bases de dados públicas (Specht *et al.*, 2010; Blaby *et al.*, 2014). Cada um desses genomas apresenta diferenças significativas em relação ao seu tamanho, conteúdo de ácido guanidílico e citidílico, quantidade de genes, organização do DNA, número de cópias por célula e em relação aos mecanismos transcricional, traducional e pós-traducional, o que os torna bastantes distintos como alvo da integração de transgenes, com diferentes vantagens e desvantagens. Trabalhos recentes têm investido principalmente na compreensão e no melhoramento das técnicas de transformação genética nuclear e plastidial de *C. reinhardtii* e no consequente acúmulo de transcritos e proteínas recombinantes (Specht *et al.*, 2010; Mussnug, 2015).

O único cloroplasto de *C. reinhardtii* é uma organela particularmente interessante para a produção de diversas proteínas heterólogas, muitas das quais são inadequadamente produzidas em outros sistemas (Almaraz-Delgado *et al.*, 2014). Conforme apresentado na Tabela 3, diversos autores estabeleceram o cloroplasto como um sistema preferencial para a produção de proteínas terapêuticas complexas como antígenos virais, bacterianos e de protozoários para o desenvolvimento de vacinas, anticorpos, imunotoxinas e enzimas.

Tabela 3: Exemplos de proteínas terapêuticas produzidas pela transformação plastidial de *C. reinhardtii*.

Proteína recombinante	Função	Referência
Anticorpo contra a glicoproteína D do vírus Herpes simplex (HSV)	Imunização passiva; ligação a proteínas do vírus	Mayfield <i>et al.</i> , 2003
Anticorpo anti-PA83 contra o antígeno protetor de <i>Bacillus anthracis</i>	Imunização passiva; ligação à toxina e neutralização	Tran <i>et al.</i> , 2009
Anticorpos anti-BoNT/A contra a neurotoxina botulínica A de <i>Clostridium botulinum</i>	Ligação à toxina e neutralização; proteção em neurônios de ratos contra os efeitos da neurotoxina; detecção da antitoxina intacta após administração a ratos de células transgênicas de <i>C. reinhardtii</i> pela via oral	Barrera <i>et al.</i> , 2015

Proteína recombinante	Função	Referência
Anticorpo anti-CD22-ETA contra CD22 fusionado ao domínio enzimático da exotoxina A de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Imunotoxina que se liga a CD22 na superfície de células B de linfoma e as mata; demonstrou inibir a proliferação celular <i>in vitro</i> e prolongar a vida de ratos com tumores de células B	Tran, Van, <i>et al.</i> , 2013
Anticorpo anti-CD22-gelonina contra CD22 fusionado à gelonina, proteína de <i>Gelonium multiflorum</i> que inibe a tradução em eucariotos	Imunotoxina que se liga especificamente a CD22 na superfície de células B de linfoma e as mata, não afetando outros tipos celulares	Tran <i>et al.</i> , 2013
TRAIL, Proteína ligante indutora de apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral	Citocina indutora de apoptose, principalmente em células tumorais; anticâncer	Yang <i>et al.</i> , 2006
Alofococianina	Anticâncer	Su <i>et al.</i> , 2005
VEGF, Fator de crescimento endotelial vascular humano	Estimula a angiogênese; tratamento de enfisema pulmonar e, possivelmente, para manejo da disfunção erétil e da depressão; demonstrou atividade em ensaio de ligação a receptor	Rasala <i>et al.</i> , 2010
HMGB1, Proteína de grupo B1 de elevada mobilidade	Reparo tecidual e potencial adjuvante no tratamento do câncer; demonstrou atividade pela indução de quimiotaxia de fibroblastos	Rasala <i>et al.</i> , 2010
MAA, Proteína amiloide do colostro de mamíferos	Capaz de induzir a síntese de mucina nas células do epitélio intestinal, protegendo contra infecções entéricas	Manuell <i>et al.</i> , 2007
VP1-CTB, Proteína VP1 do vírus da febre aftosa fusionada à subunidade β da toxina da cólera	Vacina contra o vírus da febre aftosa	Sun <i>et al.</i> , 2003
Proteína estrutural E2 do vírus da febre suína clássica	Vacina contra o vírus da febre suína clássica; indução de resposta imune em ratos após administração pela via subcutânea	He <i>et al.</i> , 2007
hGAD65, Enzima ácido glutâmico descarboxilase humana	Tratamento para retardar o início dos sintomas de diabetes tipo 1	Wang <i>et al.</i> , 2008
D2-CTB, Proteína representando o domínio de ligação à fibronectina D2 de <i>Staphylococcus aureus</i> fusionada à subunidade β da toxina da cólera	Vacina oral contra <i>S. aureus</i> ; indução de resposta imune em ratos após administração pela via oral	Dreesen <i>et al.</i> , 2010
Proteína E7 do papiloma vírus humano (HPV) 16	Vacina contra o HPV-16 e proteção contra câncer relacionado ao vírus	Demurtas <i>et al.</i> , 2013
Pfs25, Proteína 25 da superfície de <i>Plasmodium falciparum</i>	Vacina bloqueadora de transmissão de malária; desenvolvimento de anticorpos contra macrogametas e zigotos de <i>P. falciparum</i> após administração com adjuvantes pela via intraperitoneal em ratos	Gregory <i>et al.</i> , 2012; Patra <i>et al.</i> , 2015
Pfs28, Proteína 28 da superfície de <i>P. falciparum</i>	Vacina bloqueadora de transmissão de malária	Gregory <i>et al.</i> , 2012

Proteína recombinante	Função	Referência
Pfs48/45, Proteínas 48/45 da superfície de <i>P. falciparum</i>	Vacina bloqueadora de transmissão de malária	Jones <i>et al.</i> , 2013
Pfs25-CTB, Proteína 25 da superfície de <i>P. falciparum</i> fusionada à subunidade β da toxina da cólera	Vacina oral bloqueadora de transmissão de malária; indução de resposta imune em ratos após administração pela via oral	Gregory <i>et al.</i> , 2013

O genoma plastidial ou plastoma possui aproximadamente 200 kb, 35 % das bases correspondendo a guanina e citosina, incluindo 99 genes. Cada célula vegetativa contém, tipicamente, em torno de 80 a 90 cópias desse genoma, o qual parece existir tanto na forma circular quanto na linear e pode ser transformado por biobalística. A integração de transgenes no genoma do cloroplasto ocorre preferencialmente por recombinação sítio-específica entre sequências de DNA homólogas (Mussnug, 2015). A produção de proteínas recombinantes a partir do plastoma é caracterizada pela expressão estável do transgene e pelo acúmulo de altos níveis de proteína. Tipicamente, as proteínas recombinantes representam de 2 a 20 % do total de proteínas solúveis. Estes níveis são normalmente superiores aos obtidos a partir da transformação nuclear em parte pela ausência de mecanismos de silenciamento gênico em cloroplastos (Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009; Rasala e Mayfield, 2011). Embora a maquinaria de expressão gênica do cloroplasto seja de natureza procariótica, ao contrário das bactérias, essa organela contém uma variedade de chaperonas que auxiliam no enovelamento das complexas proteínas do aparato fotossintetizador. Entretanto, apesar da capacidade de formação de pontes dissulfeto, outras modificações pós-traducionais como a glicosilação não ocorrem nas proteínas sintetizadas no cloroplasto (Rasala e Mayfield, 2015).

Como muitas proteínas necessitam de processamento pós-traducional correto para o enovelamento apropriado e para a manutenção de sua atividade enzimática, o cloroplasto nem sempre é uma alternativa adequada para a produção de proteínas funcionais. Nestes casos, a expressão transgênica a partir do núcleo de *C. reinhardtii* oferece a possibilidade de direcionar as proteínas recombinantes para organelas contendo todas as enzimas responsáveis pela realização das modificações pós-traducionais necessárias (Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009). Dentre as modificações mais relevantes, destaca-se a glicosilação, a qual ocorre durante o trânsito da proteína pelo

retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi e é uma etapa necessária para aproximadamente 40 % das proteínas terapêuticas atualmente aprovadas (Rasala e Mayfield, 2015).

De acordo com a anotação mais recente, o genoma nuclear haploide de *C. reinhardtii* possui aproximadamente 110 Mb, sendo composto predominantemente por ácido guanidílico e citidílico, os quais correspondem a cerca de 65 % do total de nucleotídeos (Merchant *et al.*, 2007). Além do correto processamento pós-transcricional e pós-traducional, a transformação nuclear proporciona, também, todas as demais vantagens oferecidas por outros sistemas eucarióticos como a possibilidade de regular/induzir a expressão do transgene e de secreção da proteína recombinante no meio de cultura, simplificando o processo de purificação. Alternativamente, como no caso das vacinas de uso oral, a proteína sintetizada pode ser direcionada à membrana celular, onde epítopos antigênicos induziriam uma resposta imune após administração de células íntegras. No entanto, apesar do desenvolvimento de importantes melhorias, a expressão gênica a partir do núcleo de *C. reinhardtii* ainda é considerada ineficiente para aplicações em nível comercial, principalmente em função do baixo acúmulo das proteínas heterólogas (Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009). Conforme diversos autores, este baixo rendimento poderia estar associado à preferência de códons pela espécie *C. reinhardtii*, a mecanismos epigenéticos de silenciamento do transgene, a efeitos posicionais e relacionados à estrutura da cromatina, a processamento aberrante, a degradação por proteases, a sequências reguladoras pouco adequadas e, ainda, a outros mecanismos atualmente desconhecidos (Gangl *et al.*, 2015; Mussgnug, 2015). Presume-se que esses mecanismos tenham evoluído como uma medida de proteção contra patógenos intracelulares. Não obstante, algumas estratégias tem sido propostas para minimizar o acúmulo relativamente baixo de proteínas recombinantes codificadas no genoma nuclear de *C. reinhardtii* (Specht *et al.*, 2010). Entre elas, destaca-se o direcionamento da proteína recombinante aos cloroplastos para armazenamento em um ambiente menos suscetível à degradação e o desenvolvimento de linhagens mutantes capazes de acumular altos níveis de proteínas recombinantes, em razão da deficiência de proteases ou de mecanismos epigenéticos de silenciamento (Neupert *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2015). Além disso, é consenso entre a maioria dos autores que a expressão transgênica em *C. reinhardtii* depende fortemente de elementos reguladores não codificadores e vários destes elementos que promovem a expressão estável do

transgene têm sido identificados (Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2011; Mussnug, 2015; Rasala e Mayfield, 2015).

Os elementos mais importantes para a obtenção de altos níveis de transcritos em *C. reinhardtii* são os promotores e as regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRs, do inglês, *untranslated regions*). Enquanto os promotores são responsáveis pelo início da transcrição, as regiões não traduzidas influenciam a estabilidade do mRNA e regulam sua tradução (Rasala e Mayfield, 2011). Os melhores e mais utilizados promotores constitutivos para a expressão heteróloga nuclear em *C. reinhardtii* são os derivados de genes altamente expressos nessa microalga, principalmente os promotores dos genes codificadores da subunidade menor da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RBCS2) e da β 2-tubulina (β 2-Tub), associados às regiões não traduzidas do gene *RBCS2* (Griesbeck *et al.*, 2006; Rosales-Mendoza *et al.*, 2012). Promotores sintéticos também têm sido desenvolvidos pela fusão do promotor do gene que codifica a proteína de choque térmico 70A (HSP70A) a montante de outros promotores nucleares de *C. reinhardtii*. Nessas construções, HSP70A atua como um ativador transcricional de promotores como RBCS2 e β 2-Tub, aumentando os níveis de transcrição em condições induzíveis como choque térmico, por exemplo (Schroda *et al.*, 2000).

Além dos promotores e das regiões não traduzidas, a integração de íntrons de genes nativos em sequências heterólogas tem demonstrado exercer uma forte influência na eficiência da expressão transgênica em *C. reinhardtii*. De fato, a presença desses elementos parece ter considerável relevância nessa espécie uma vez que a maioria dos genes nucleares de *C. reinhardtii* contém um ou mais íntrons (Mussnug, 2015). Lumbreras *et al.* (1998) demonstraram que a inserção do íntron 1 do gene *RBCS2* a jusante do promotor quimérico exerce efeito positivo nos níveis de expressão por conter, em sua sequência, um elemento acentuador (do inglês, *enhancer*) que potencializa a transcrição do transgene.

Por fim, a expressão gênica em sistemas heterólogos tem evidenciado a importância da otimização de códons para o aumento do acúmulo de proteínas. Genes heterólogos normalmente são transcritos em códons que não acompanham a tendência observada em *C. reinhardtii*, podendo resultar na pausa da tradução em função da escassez de tRNA frente a códons pouco comuns ou, ainda, na incorporação de

aminoácidos incorretos e no truncamento da proteína. Para evitar esse problema, diversos programas computacionais permitem a projeção de sequências de genes heterólogos com códons preferencialmente usados por *C. reinhardtii*. Essa estratégia, relativamente simples diante dos recentes avanços na tecnologia de síntese de DNA, é uma etapa efetiva e necessária para aumentar o acúmulo de proteínas e, também, pode reduzir a suscetibilidade do transgene ao silenciamento (Potvin e Zhang, 2010; Gong *et al.*, 2011; Rosales-Mendoza *et al.*, 2012).

Localizado na *University of Minnesota* nos EUA, o *Chlamydomonas Resource Center* abriga um amplo acervo de linhagens celulares de *Chlamydomonas*, específicas para as mais variadas aplicações científicas. Dentre essas linhagens, destacam-se as deficientes em parede celular, adequadas a determinados métodos de transformação, e diversas linhagens mutantes de especial utilidade quando a estratégia de seleção dos transformantes envolve a complementação do mutante com um gene funcional (Mussgnug, 2015). Além disso, o centro também conta com um repositório de vetores para a transformação nuclear e plastidial, contendo diversos elementos reguladores controlando, por exemplo, a expressão de vários genes repórteres e diferentes marcadores de seleção. Em *C. reinhardtii*, versões sintéticas de genes heterólogos com códons adaptados à espécie como *gfp*, que codifica a proteína de fluorescência verde (GFP, do inglês, *green fluorescent protein*), e *Luc*, codificador da enzima luciferase, têm sido empregadas como eficientes repórteres para a avaliação da expressão gênica (Gong *et al.*, 2011; Gangl *et al.*, 2015).

O sucesso de qualquer protocolo de transformação genética depende da disponibilidade de eficientes marcadores para a adequada seleção dos transformantes. Embora os primeiros marcadores de seleção empregados na transformação nuclear de *C. reinhardtii* atuassem pela complementação fenotípica de linhagens mutantes, os marcadores mais utilizados atualmente conferem resistência a antibióticos ou herbicidas às células transformadas (Potvin e Zhang, 2010). O gene *aph7⁺*, por exemplo, codificador da enzima aminoglicosídeo fosfotransferase de *Streptomyces hygrosopicus*, tem sido usado sob o controle do promotor β 2-Tub para a seleção de clones de *C. reinhardtii* resistentes à higromicina B (Berthold *et al.*, 2002).

No passado, o uso simultâneo de dois vetores plasmídias, um com o gene de interesse e o outro com o marcador de seleção, era rotineiramente empregado para a

transformação nuclear de *C. reinhardtii*. Nesses experimentos, como a integração de cada um dos plasmídeos no genoma nuclear ocorria de forma independente, os índices de coexpressão normalmente não passavam de 10 %. Entretanto, em razão do progresso nas estratégias de construção de vetores e da redução dos custos para a síntese de DNA, atualmente os vetores de expressão incorporam tanto o gene de interesse como o marcador e, em alguns casos, facilmente permutáveis por outros genes, resultando em taxas de coexpressão de até 70 % (Heitzer e Zschoernig, 2007; Mussnug, 2015). Uma destas estratégias que vem sendo muito utilizada para a construção dos mais diversos vetores baseia-se na recombinação sítio-específica mediada pelo sistema *Cre/lox* do bacteriófago P1, em que dois plasmídeos independentes contendo cassetes de expressão diferentes, mas uma mesma sequência de reconhecimento específica, o sítio *lox*, são eficientemente fusionados pela atividade da enzima Cre-recombinase. Desta forma, grandes vetores de expressão contendo mais de um transgene podem ser construídos de forma simples, independentemente da ausência ou da presença indesejada de sítios de restrição. Antes da transformação, a hidrólise dos vetores com endonucleases promove a linearização e a eliminação de sequências plasmídicas desnecessárias que poderiam estimular o silenciamento gênico em *C. reinhardtii* proporcionando, assim, melhores resultados em termos de coexpressão e rendimento (Heitzer e Zschoernig, 2007).

A integração do DNA exógeno no genoma nuclear de *C. reinhardtii* requer a permeabilização temporária da membrana celular a fim de permitir o ingresso das moléculas do vetor. Para isso, o método mais simples consiste na agitação de uma suspensão de células na presença de DNA e micropartículas de vidro. A ação abrasiva das partículas cria poros temporários na membrana das células que devem ser de linhagens mutantes sem parede celular (Rosenberg *et al.*, 2008). Entretanto, Shimogawara *et al.* (1998) demonstraram maior eficiência de transformação com o emprego da eletroporação. Nesse método, independentemente da presença de parede celular, a curta exposição a um campo elétrico de alta intensidade promove a permeabilização reversível da membrana, permitindo a entrada do DNA exógeno e sua integração no núcleo (Mussnug, 2015). Embora essas sejam as técnicas mais utilizadas, outros métodos como biobalística e transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* também têm sido empregados com sucesso para a transformação nuclear de *C. reinhardtii* (Gangl *et al.*, 2015). Apesar do método de transformação empregado, a integração estável do transgene no núcleo de *C. reinhardtii*

normalmente ocorre de forma aleatória, pela junção de extremidades não homólogas. Desta forma, dependendo de sua posição no genoma nuclear, a expressão do transgene pode variar consideravelmente entre as diferentes linhagens transformadas (Rosenberg *et al.*, 2008; Rasala e Mayfield, 2015).

Seguindo essas estratégias, proteínas terapêuticas ainda mais complexas que as sintetizadas no cloroplasto foram produzidas por meio da transformação do genoma nuclear de *C. reinhardtii* (Tabela 4). Entretanto, a variedade de proteínas recombinantes produzidas até então a partir desse método de transformação é, de fato, muito inferior à obtida a partir da transformação plastidial. Apesar desse número limitado, a correta conformação, resultante do processamento adequado, e a demonstração de atividade dessas moléculas ilustram, mais uma vez, o potencial de *C. reinhardtii* como um sistema alternativo para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico.

Tabela 4: Proteínas terapêuticas produzidas pela transformação nuclear de *C. reinhardtii*.

Proteína recombinante	Função	Referência
Eritropoietina humana	Tratamento da anemia	Eichler-Stahlberg <i>et al.</i> , 2009
Antígeno GBSS-AMA1 da membrana apical de <i>Plasmodium berghei</i> fusionado à proteína amido sintase ligada ao grânulo, principal proteína associada à matriz de amido	Vacina contra malária; indução de resposta imune em ratos após administração pelas via oral e intraperitoneal	Dauvillée <i>et al.</i> , 2010
Antígeno GBSS-MSP1 de superfície de <i>P. berghei</i> fusionada à proteína amido sintase ligada ao grânulo	Vacina contra malária; indução de resposta imune em ratos após administração pelas via oral e intraperitoneal	Dauvillée <i>et al.</i> , 2010
Selenoproteína Sep15 humana de 15 kDa	Suplementação de selênio	Hou <i>et al.</i> , 2013

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral que norteou o desenvolvimento deste trabalho foi a expressão do gene codificador da glicocerebrosidase humana a partir do genoma nuclear de *Chlamydomonas reinhardtii* visando a produção, com menor custo, da enzima recombinante como uma possível alternativa para a terapia de reposição enzimática, atualmente o tratamento padrão e extremamente oneroso para a doença de Gaucher.

2.2 Objetivos específicos

- Projeção e síntese da sequência do gene *HsGBA* com os códons otimizados para expressão nuclear em *C. reinhardtii* e sítios de restrição estratégicos.
- Estabelecimento de culturas de *C. reinhardtii*.
- Adaptação de *HsGBA* e do gene repórter *gfp* a plasmídeo de expressão em *C. reinhardtii*.
- Transformação genética nuclear de *C. reinhardtii* com vetores de expressão contendo *HsGBA* e *gfp* por eletroporação, seleção e manutenção de linhagens recombinantes.
- Identificação de linhagens de *C. reinhardtii* *gfp* e *HsGBA*-positivas e comprovação da expressão transgênica.
- Otimização das condições de indução para máxima expressão de *HsGBA*.
- Detecção da proteína HsGBA recombinante produzida pelas linhagens transformadas de *C. reinhardtii*.
- Avaliação da atividade enzimática de HsGBA em extratos proteicos de *C. reinhardtii*.

3. Materiais e métodos

3.1 Construção de plasmídeos

3.1.1 Projeção de sequência e síntese do gene *HsGBA*

A sequência do gene *HsGBA* (NCBI Reference Sequence: NM_001005741.1) foi projetada a partir do cDNA humano com os códons otimizados para expressão nuclear em *C. reinhardtii*, com a colaboração do Prof. Dr. Diego Bonatto. Para tanto, foi utilizada a ferramenta *Codon Optimization Tool* da *Integrated DNA Technologies* (IDT), disponível em <https://www.idtdna.com/CodonOpt>.

Após adição de sítios de restrição estratégicos para a ligação do gene de interesse em plasmídeos usados na transformação nuclear, a sequência resultante foi encaminhada à empresa GenScript USA Inc. para síntese. Após a síntese, a sequência nucleotídica foi ligada e fornecida pela GenScript no vetor pUC57, o qual confere resistência à ampicilina às células de *E. coli*. Assim como para os demais plasmídeos descritos a seguir, a purificação do plasmídeo pUC57-*HsGBA* a partir de células de *E. coli* foi realizada segundo o protocolo de “minipreparação” descrito por Ausubel *et al.* (2002), seguido de purificação por cromatografia de troca iônica conforme o *PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen) quando utilizado em clonagens e recombinações.

3.1.2 Adaptação de *HsGBA* e *gfp* a plasmídeo de expressão em *C. reinhardtii*

A fim de se adaptar o gene *HsGBA* para expressão em *C. reinhardtii*, dois plasmídeos foram adquiridos do *Chlamydomonas Resource Center*: pHsp70A/RbcS2-*cgLuc* e pKS-*aph7*⁻-lox. O plasmídeo pKScGFP foi também adquirido para a avaliação da expressão do gene repórter *gfp* em paralelo aos experimentos com *HsGBA*.

3.1.3 Vetor pHsp70A/RbcS2-*cgLuc*

O vetor pHsp70A/RbcS2-*cgLuc* (Figura 3) contém o gene codificador da enzima luciferase de *Gaussia princeps* com códons adaptados para expressão em *C.*

reinhardtii e sob controle do promotor quimérico HSP70A/RBCS2 e da região 3'-UTR do gene *RBCS2* de *C. reinhardtii* (Fuhrmann *et al.*, 2004; Heitzer e Zschoernig, 2007; Ruecker *et al.*, 2008). Além disso, esse vetor contém um sítio *loxP* para recombinação pelo sistema Cre/*lox* com o plasmídeo pKS-*aph7*'-*lox*, além da origem de replicação R6K γ para manutenção em células de *E. coli* PIR1 (Invitrogen), às quais confere resistência à canamicina.

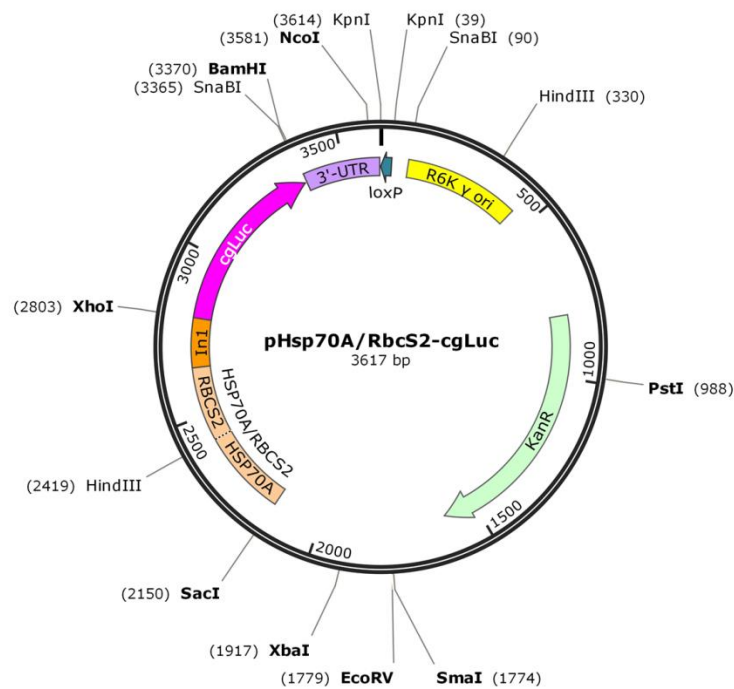


Figura 3: Mapa do vetor pHsp70A/RbcS2-*cgLuc*, criado com o *software SnapGene* 2.8.1 a partir da sequência nucleotídica do plasmídeo fornecida pelo *Chlamydomonas Resource Center*. Além do gene codificador da enzima luciferase (*cgLuc*), estão representados o gene marcador de seleção para canamicina (*KanR*), a origem de replicação (*R6K γ ori*), o sítio *loxP* e os sítios para enzimas de restrição presentes no plasmídeo mais externo ao círculo, com posições em pb indicadas entre parênteses. HSP70A/RBCS2: promotor quimérico contendo o promotor da proteína de choque térmico 70A (HSP70A) e o promotor da subunidade menor da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RBCS2); In1: íntron 1 do gene *RBCS2*; 3'-UTR: região 3'-não traduzida do gene *RBCS2*.

3.1.4 Vetor pKS-*aph7''*-lox

O plasmídeo pKS-*aph7''*-lox (Figura 4) é um vetor de expressão em *C. reinhardtii* que contém o gene codificador da enzima aminoglicosídeo fosfotransferase (*aph7''*) de *S. hygroscopicus*, a qual confere resistência à higromicina B (Berthold *et al.*, 2002; Heitzer e Zschoernig, 2007). Nesse plasmídeo, o gene *aph7''* contém uma cópia do íntron 1 do gene *RBCS2* e está sob o controle do promotor da β 2-Tub e da região 3'-UTR da clamiopsina-1. A inserção de um sítio *loxP* no vetor permite a recombinação pelo sistema *Cre/lox* com o plasmídeo pHsp70A/RbcS2-*cgLuc* e o marcador de seleção confere resistência à ampicilina a células de *E. coli* DH5 α .

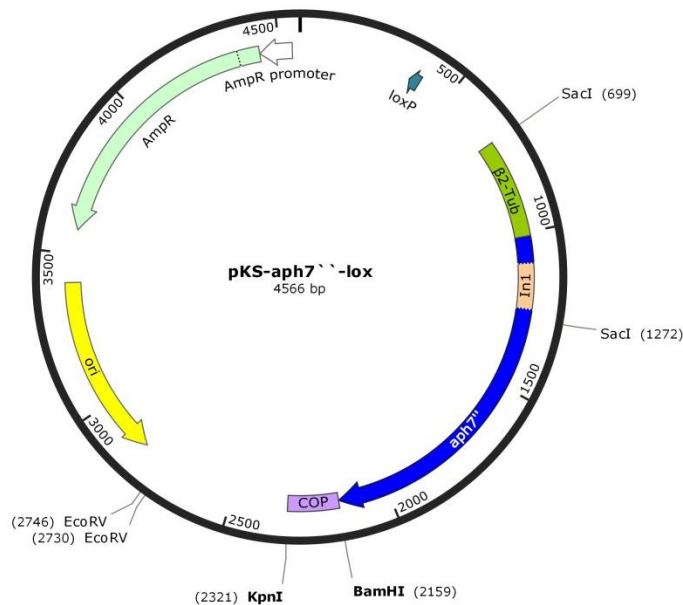


Figura 4: Mapa do vetor pKS-*aph7''*-lox, criado com o *software SnapGene 2.8.1* a partir da sequência nucleotídica do plasmídeo fornecida pelo *Chlamydomonas Resource Center*. Além do gene codificador da enzima aminoglicosídeo fosfotransferase (*aph7''*), contendo uma cópia do íntron 1 de *RBCS2* (In1), estão representados o marcador de seleção para ampicilina (AmpR), a origem de replicação (ori), o sítio *loxP* e os sítios para enzimas de restrição presentes no plasmídeo e respectivas posições em pb. β 2-Tub: promotor da β 2-tubulina; COP: 3'-UTR da clamiopsina-1.

3.1.5 Vetor pKScGFP

O vetor pKScGFP (Figura 5) contém o gene sintético codificador da GFP de *Aequorea victoria* com códons adaptados para expressão em *C. reinhardtii* inserido no vetor pBluescriptKS- (Stratagene) via XhoI/BamHI (Fuhrmann *et al.*, 1999). Esse plasmídeo confere resistência à ampicilina a células de *E. coli*.

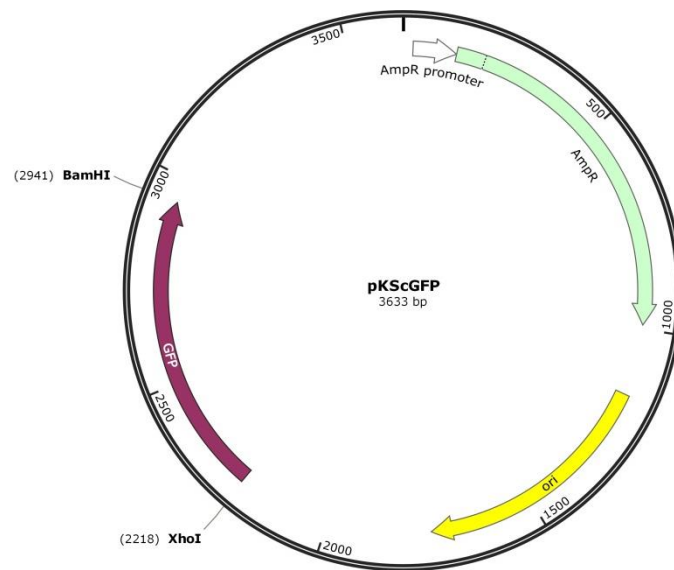


Figura 5: Mapa do vetor pKScGFP, criado com o *software SnapGene 2.8.1* a partir da sequência nucleotídica do plasmídeo fornecida pelo *Chlamydomonas Resource Center*. Além do gene codificador da proteína de fluorescência verde (GFP), estão representados o marcador de seleção para ampicilina (AmpR), a origem de replicação (ori) e os sítios de restrição para XhoI e BamHI com as respectivas posições em pb.

3.1.6 Vetor pHsp70A/RbcS2-HsGBA

Após digestão de 6 µg do vetor pUC57-HsGBA com as enzimas XhoI (SlaI, Jena Bioscience) e BamHI (NE Biolabs), por 3 h a 37 °C, o fragmento de 1.617 pb correspondente ao gene *HsGBA* foi purificado a partir de gel de agarose a 0,8 % submetido à eletroforese, conforme o método de *Freeze-squeeze* proposto por Tautz e Renz (1983). Com o objetivo de substituir o gene *cgLuc* (567 pb) por *HsGBA*, o mesmo

tratamento foi aplicado ao plasmídeo pHsp70A/RbcS2-*cgLuc*, resultando em um fragmento purificado de 3.050 pb correspondente ao vetor sem o inserto. Esses dois fragmentos obtidos foram então ligados por ação da enzima T4 DNA Ligase (Ludwig Biotec) na proporção molar vetor:fragmento de 1:3, a 16 °C por 18 h, originando o vetor pHsp70A/RbcS2-*HsGBA*.

Células termocompetentes de *E. coli* PIR1 (Invitrogen) foram preparadas segundo o protocolo descrito por Inoue *et al.* (1990). Um total de 100 µL da suspensão celular foi transformado geneticamente com o plasmídeo pHsp70A/RbcS2-*HsGBA* resultante (10 µL da reação de ligação) por choque térmico a 42 °C por 2 min, após incubação da mistura (células com plasmídeo) em gelo por 20 min. Na sequência, após adição de 1 mL de meio CircleGrow[®] (Q-BIOgene) e incubação com agitação por 1 h a 37 °C, 100 µL da suspensão bacteriana foram distribuídos em meio CircleGrow[®] sólido contendo 50 mg/L de canamicina e mantidos por 18 h a 37 °C.

Plasmídeos foram purificados a partir das colônias de *E. coli* PIR1 resultantes conforme protocolo de “minipreparação” descrito por Ausubel *et al.* (2002) e seguido por purificação por cromatografia de troca iônica (*PureLink[®] Quick Plasmid Miniprep Kit*, Invitrogen).

3.1.7 Vetor pHsp70A/RbcS2-*GFP*

Para a construção do vetor pHsp70A/RbcS2-*GFP*, o fragmento de 723 pb correspondente ao gene *gfp* foi clivado do plasmídeo pKSc*GFP* com as enzimas XhoI (SlaI, Jena Bioscience) e BamHI (NE Biolabs) e ligado ao fragmento de 3.050 pb resultante da digestão de pHsp70A/RbcS2-*cgLuc* com as mesmas enzimas, seguindo-se a mesma estratégia descrita para o plasmídeo pUC57-*HsGBA* na seção 3.1.6.

3.1.8 Vetor pKS-*aph7⁺*-lox::*HsGBA*

O vetor de expressão em *C. reinhardtii* pKS-*aph7⁺*-lox::*HsGBA*, com cassetes de expressão em *tandem* para o gene de interesse *HsGBA* e o marcador de seleção

aph7⁻, foi construído com a fusão do plasmídeo pHsp70A/RbcS2-*HsGBA* ao vetor pKS-*aph7*⁻-lox, contendo o marcador de seleção, *in vitro*, por recombinação sítio-específica mediada pela enzima Cre-recombinase (New England Biolabs), conforme descrito por Heitzer e Zschoernig (2007).

3.1.9 Vetor pKS-*aph7*⁻-lox::*GFP*

Para a construção do vetor de expressão em *C. reinhardtii* pKS-*aph7*⁻-lox::*GFP*, com cassetes de expressão em *tandem* para o gene repórter *gfp* e o marcador de seleção *aph7*⁻, a recombinação entre os plasmídeos pHsp70A/RbcS2-*GFP* e pKS-*aph7*⁻-lox foi realizada conforme descrito na seção 3.1.8.

3. 2 Linhagens de *C. reinhardtii*, condições de cultivo e transformação

3. 2. 1 Estabelecimento de culturas de *C. reinhardtii*

A linhagem de *C. reinhardtii* CC-400 cw15 mt+ foi gentilmente fornecida pelo Laboratório de Genômica e Expressão da Universidade de Campinas (Dra. Laudiene Meyer e Dr. Gonçalo A. G. Pereira), sendo cultivada em meio TAP líquido e sólido (Gorman e Levine, 1965), entre 23 e 25 °C, com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro. Esta linhagem é deficiente em parede celular, característica necessária para a transformação por eletroporação.

3. 2. 2 Transformação genética nuclear de *C. reinhardtii*

Células da linhagem de *C. reinhardtii* CC-400 cw15 mt+ foram transformadas geneticamente por eletroporação com o plasmídeo pKS-*aph7*⁻-lox::*HsGBA* nas formas circular e linearizada conforme Shimogawara *et al.* (1998) com algumas modificações. O equipamento de eletroporação utilizado foi o *GenePulser II*[®] acoplado ao *Pulse Controller Plus*[®] e ao *Capacitance Extender Plus*[®] (Bio-Rad). Para a transformação nuclear, células de *C. reinhardtii* (250 µL de suspensão a aproximadamente 2x10⁶

células/mL) foram coletadas por centrifugação a 3.500 rpm por 5 min à temperatura ambiente e ressuspensas em 1,25 mL de meio TAP contendo 40 mM de sacarose. Após incubação em gelo por 10 min, 250 µL dessa suspensão foram transferidos para cubetas de eletroporação contendo, aproximadamente, 4 µg do plasmídeo pKS-*aph7*^{-lox::HsGBA} clivado com EcoRV (por 2 h a 37 °C) ou 1 µg desse vetor na forma circular/supertorcida. Ambas as formas do plasmídeo foram purificadas por cromatografia de troca iônica (*PureLink*[®] *Quick Plasmid Miniprep Kit*, Invitrogen) antes da transformação. Após 5 min em temperatura ambiente, a cubeta com as células e plasmídeo linearizado foi levada a eletroporador, sendo submetida a um pulso elétrico de 0,73 kV por 2,9 ms. Para as células transformadas com o plasmídeo na forma circular, o pulso elétrico aplicado foi de 0,74 kV por 2,28 ms. Em ambos os casos, a capacitância foi de 25 µF. Em seguida, as cubetas foram mantidas por 10 min à temperatura ambiente e, após adição de 1 mL de uma suspensão de amido a 20 % em meio TAP contendo 40 mM de sacarose e 0,4 % de PEG 8.000, seu conteúdo foi distribuído em placas de Petri contendo meio TAP sólido com 10 mg/L de higromicina B. Após secarem no escuro, as placas foram incubadas entre 23 e 25 °C com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro por 7 dias.

Essa mesma metodologia foi empregada para a transformação nuclear de *C. reinhardtii* com o vetor pKS-*aph7*^{-lox::GFP}, exceto quanto à duração do pulso elétrico de 0,74 kV aplicado que, no caso das células com o plasmídeo linearizado, foi de 3,12 ms, enquanto nas transformadas com o vetor na forma circular foi de 2,14 ms.

3. 2. 3 Manutenção de culturas de *C. reinhardtii* transformadas com pKS-*aph7*^{-lox::HsGBA} e com pKS-*aph7*^{-lox::GFP}

A partir das colônias obtidas após transformação por eletroporação (seção 3.2.2), foram estabelecidas culturas-estoque de 36 linhagens de *C. reinhardtii* transformadas com o plasmídeo pKS-*aph7*^{-lox::HsGBA} linearizado e 36 linhagens transformadas com o vetor pKS-*aph7*^{-lox::GFP}, também linearizado, sendo mantidas em meio TAP líquido e sólido sob seleção com 10 mg/L de higromicina B entre 23 e 25 °C com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro.

3. 3 Identificação de linhagens de *C. reinhardtii* HsGBA-positivas

A extração de DNA total das linhagens de *C. reinhardtii* foi realizada pelo método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987). As amostras de DNA foram quantificadas e sua qualidade (razão A_{260}/A_{280}) avaliada por método espectrofotométrico utilizando o equipamento NanoDrop 2000c[®] (Thermo Scientific) e instruções do fabricante.

PCRs foram realizadas para a comprovação da integração de *HsGBA* no genoma das 36 linhagens de *C. reinhardtii* transformadas com o vetor pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA*. Como controles negativos, foram utilizadas amostras de DNA extraídas de linhagens *wild-type* (A5 e A7) e linhagens transformadas com o plasmídeo pKS-*aphT*⁻-lox::*GFP* (B3, C12 e D7).

Primers para amplificação do gene-referência *RBCS2B* (*forward* CrRBCS2B-For: 5'-ACAGAGCCATAGCGTGGAATCACT-3'; *reverse* CrRBCS2B-Rev2: 5'-AAGCTACCGCTTCAGCACTTGAGA-3') foram utilizados como controle positivo, especialmente na validação da PCR para amplificação de *HsGBA* a partir do genoma das linhagens transformadas, empregando-se as condições apresentadas nas Tabelas 5 e 6 (temperatura de anelamento (x): 55 °C; tempo de extensão (y): 1 min).

Tabela 5: Reagentes e quantidades utilizadas em PCRs para detecção do gene-referência *RBCS2B* e do transgene *HsGBA* em DNA de *C. reinhardtii*.

Reagente	Volume (µL) para 1 reação
Água ultrapura	11,8
5X <i>Colorless GoTaq Flexi Buffer</i> (Promega)	5,0
25 mM MgCl ₂ (Promega)	2,0
5 mM dNTP's (Ludwig Biotec)	1,0
10 µM <i>Primer Forward</i> (IDT)	1,0
10 µM <i>Primer Reverse</i> (IDT)	1,0
5 U/µL <i>GoTaq Hot Start Polymerase</i> (Promega)	0,2
DNA-molde	3,0
Total	25,0

Tabela 6: Parâmetros para termociclagem em PCRs para detecção do gene-referência *RBCS2B* e do transgene *HsGBA* em DNA de *C. reinhardtii*.

Etapa		Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial	Ciclo único	95	2
Desnaturação		95	1
Anelamento	30 ciclos	x	1
Extensão		72	y
Extensão final	Ciclo único	72	5

A amplificação de *RBCS2B* foi confirmada com o *primer* CrRBCS2B-For e um segundo *reverse primer* (CrRBCS2B-Rev1: 5'-AAGGGTGAACGAGGGACAAAGACA-3'), com os mesmos parâmetros descritos nas Tabelas 5 e 6 (exceto quanto ao volume de DNA molde (2 µL); temperatura de anelamento (x): 55 °C; tempo de extensão (y): 30 s).

Para a amplificação do gene *HsGBA*, foram usados os *primers* HsGBA-For-TOPO (*forward*: 5'-CACCATGGAGTTCAGCAGCCCC-3') e HsGBA-Rev (*reverse*: 5'-TTACTGGCGCCACAGG-3'), seguindo-se o programa de *touchdown (TD) PCR* descrito na Tabela 7, elaborado conforme protocolo proposto por Korbie e Mattick (2008). Para as reações, foi utilizada a mistura apresentada na Tabela 5 e, como controle positivo, foi empregado 1 µL de DNA plasmidial da construção pKS-*aph7*-lox::*HsGBA*.

Tabela 7: Programa de *TD-PCR* (reações com *primers* HsGBA-For-TOPO e HsGBA-Rev) para detecção do transgene *HsGBA* em DNA de *C. reinhardtii*.

Fase	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	95 °C	3 min
2	Desnaturação	95 °C	30 s
3	Anelamento	72 °C	45 s
4	Extensão	72 °C	2 min
Etapas 2-4 repetidas 15 vezes, reduzindo-se a temperatura de anelamento em 1 °C a cada ciclo			

Fase	Etapa	Temperatura	Tempo
5	Desnaturação	95 °C	30 s
6	Anelamento	58 °C	45 s
7	Extensão	72 °C	2 min
8	Extensão final	72 °C	5 min
Etapas 5-7 repetidas 30 vezes			

Os resultados positivos foram confirmados por novas reações com um segundo par de *primers* (*forward* HsGBA-For-qPCR: 5'-ATCACCAACCTGCTGTACCA-3'; *reverse* HsGBA-Rev-qPCR: 5'-GAACATGGGCTGCTTGTAGA-3'), empregando-se os mesmos parâmetros descritos nas Tabelas 5 e 6 (exceto quanto ao volume de DNA molde (2 µL); temperatura de anelamento (x): 54 °C; tempo de extensão (y): 30 s). Como controle positivo, também foi utilizado 1 µL (aproximadamente 100 ng) de DNA plasmidial da construção pKS-*aph7*⁻-lox::*HsGBA*.

Todas as reações foram executadas em termociclador *LGC XP Cycler*[®] (Bioer Technology).

3. 4 Identificação de linhagens de *C. reinhardtii* *gfp*-positivas

A fim de se verificar a integração do gene repórter *gfp* no genoma das linhagens de *C. reinhardtii* B3, C12 e D7 (transformadas com pKS-*aph7*⁻-lox::*GFP*) por PCR, a extração de DNA foi realizada conforme descrito na seção 3. Amostras de DNA extraídas das linhagens A5 (*wild-type*) e F6 (transformada com o plasmídeo pKS-*aph7*⁻-lox::*HsGBA*) foram empregadas como controles negativos. Como controle positivo, foi utilizado 1 µL (cerca de 100 ng) de DNA plasmidial da construção pKS-*aph7*⁻-lox::*GFP*.

Os *primers* CrcGFP-For (*forward*: 5'-TGACCCTGAAGTTCATCTGCACCA-3') e CrcGFP-Rev (*reverse*: 5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3') e a mistura apresentada na Tabela 5 foram utilizados para a amplificação de *gfp* segundo um programa de *TD-PCR* simplificado, conforme descrito na Tabela 6, modificado com três passos contendo diferentes temperaturas de anelamento (x). No primeiro passo, a etapa de anelamento foi a 58 °C por 3 ciclos; no segundo, a 56 °C também por 3 ciclos; e, no

terceiro passo, a 54 °C por 24 ciclos. Em todos os passos, o tempo de extensão (y) foi de 2 min. Todas as reações foram executadas em termociclador *LGC XP Cyclex*[®] (Bioer Technology).

3. 5 Análises da expressão de *HsGBA* em *C. reinhardtii*

3. 5. 1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para a extração de RNA, células de *C. reinhardtii* foram cultivadas em 220 mL de meio TAP contendo 10 mg/L de higromicina B em frascos Erlenmeyer de 2 L mantidos sem agitação a 23-25 °C e com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro. As culturas foram mantidas nestas condições até atingirem uma densidade de aproximadamente 5×10^6 células/mL. Para avaliar a expressão de *HsGBA*, suspensões de *C. reinhardtii* foram submetidas a um choque térmico a 40 °C por 1 h, seguido por um período de recuperação de 2 h a 25 °C (Schroda *et al.*, 2000). Após choque térmico, as células foram concentradas e fracionadas para a extração de RNA total pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). A avaliação da qualidade das amostras foi realizada por inspeção visual de bandas características de preparações de RNA total íntegro em gel de agarose a 1 % corado com brometo de etídeo e submetido à eletroforese. A avaliação da qualidade das amostras, assim como a quantificação das mesmas, foi também realizada por método espectrofotométrico em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) segundo orientações do fabricante.

Para a eliminação de DNA contaminante, as amostras de RNA foram tratadas com a enzima *RQ1 RNase-Free DNaseI* (Promega) segundo as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi feita com a enzima transcriptase reversa M-MLV (Sigma) também seguindo-se as instruções do fabricante.

3. 5. 2 Avaliação da expressão de *HsGBA* por RT-PCR

A presença de mRNA derivado de *HsGBA* nas cinco linhagens de *C. reinhardtii* identificadas como portadoras do transgene (F5, F6, F9, G1 e G5) foi avaliada qualitativamente por RT-PCR empregando-se como referência o gene da

subunidade menor da enzima RuBisCO (*RBCS2*). Para as análises dos cDNAs (3 µL), foram utilizados os mesmos pares de *primers* (CrRBCS2B-For e CrRBCS2B-Rev2; CrRBCS2B-For e CrRBCS2B-Rev1; HsGBA-For-TOPO e HsGBA-Rev; HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR), mistura de reação e parâmetros de termociclagem descritos na seção 3. Como controle positivo da amplificação de *HsGBA*, foi empregado 0,3 µL de DNA plasmidial de pKS-*aph7*⁻-lox::*HsGBA*. A linhagem de *C. reinhardtii* D7, transformada com o plasmídeo pKS-*aph7*⁻-lox::*GFP*, foi utilizada como controle negativo. Todas as reações foram executadas em termociclador *LGC XP Cyclor*[®] (Bioer Technology).

3. 5. 3 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento do DNA resultante das RT-PCRs com o emprego dos *primers* HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR, a partir de cDNA das linhagens de *C. reinhardtii* F6 e G1, foi realizado pela ACTGene Análises Moleculares Ltda. utilizando o sequenciador automático AB 3500 *Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Cerca de 40 ng de DNA foram marcados utilizando-se 2,5 pmol de cada *primer* (HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR) e 0,5 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart* (Applied Biosystems), em um volume final de 10 µL, com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min, seguida de 25 ciclos em temperaturas de 96 °C por 10 s, 55 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. Após purificação por precipitação com isopropanol a 75 % e lavagem com etanol a 60%, os produtos foram desnaturados em 10 µL de formamida a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados com o programa *Data Collection 2* (Applied Biosystems) e o alinhamento entre as sequências obtidas e a sequência de *HsGBA* foi executado com o emprego do *software Clustal Omega* (Sievers *et al.*, 2011).

3. 5. 4 Otimização das condições de indução da expressão de *HsGBA*

Para se estabelecer as condições em que ocorre a maior expressão do gene *HsGBA*, células de *C. reinhardtii* D7 (controle negativo) e G1 (teste) foram cultivadas em 220 mL de meio TAP contendo 10 mg/L de higromicina B entre 23 e 25 °C e com

fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro. Ao atingirem a densidade de, aproximadamente, 5×10^6 células/mL, as suspensões foram fracionadas em sete alíquotas de 30 mL e cada alíquota foi submetida a choque térmico por diferentes tempos (t_0 a t_6), conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Condições para o choque térmico (experimento de *time-course*).

Condição	Choque térmico		Recuperação	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
t_0	suspensão de células cultivadas a 25 °C			
t_1	40 °C	10 min	–	
t_2	40 °C	30 min	–	
t_3	40 °C	60 min	–	
t_4	40 °C	60 min	25 °C	30 min
t_5	40 °C	60 min	25 °C	60 min
t_6	40 °C	60 min	25 °C	120 min

Após cada condição, a suspensão de células foi imediatamente concentrada por centrifugação para extração de RNA total e síntese de cDNA (conforme seção 3.5.1). A expressão de *HsGBA* em cada condição foi avaliada qualitativamente por RT-PCR, seguindo-se a mesma metodologia descrita na seção 3.5.2.

3. 6 Ensaios para detecção da proteína recombinante HsGBA

Todos os ensaios para detecção da proteína HsGBA foram executados no laboratório Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda., com a colaboração das pesquisadoras Dra. Ana C. O. Dias, Dra. Gaby Renard e Dra. Jocelei M. Chies.

3. 6. 1 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE

Para análise do extrato proteico e detecção da proteína recombinante HsGBA, células das linhagens de *C. reinhardtii* D7 (controle negativo) e G1 (teste) foram cultivadas em 220 mL de meio TAP contendo 10 mg/L de higromicina B entre 23 e 25

°C e com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro. Ao atingirem a densidade de, aproximadamente, 5×10^6 células/mL, cada suspensão foi fracionada em duas alíquotas de 100 mL, sendo uma alíquota submetida a choque térmico a 40 °C por 30 min e a outra por 60 min. Após choque térmico, cada suspensão de células foi imediatamente concentrada por centrifugação e fracionada em microtubos. A extração de proteínas foi realizada por ultrassonicação de uma fração de células (cerca de 2×10^8) correspondente a cada tratamento (D7 e G1, em 30 e em 60 min) ressuspensa em 500 µL de Tris a 50 mM, pH 8,0, quatro vezes por 10 s, com intervalos de 1 min. Após centrifugação e separação do sobrenadante contendo as proteínas solúveis, o sedimento resultante, contendo as proteínas insolúveis, foi ressuspensa em 500 µL de Tris a 50 mM, pH 8,0.

Dez (10) µL de cada fração (solúvel e insolúvel) correspondente a cada tratamento (D7 e G1, em 30 e em 60 min) foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 % empregando-se, como controle positivo, 2 µg de glicocerebrosidase purificada (Cerezyme[®], Genzyme). Após eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

3. 6. 2 Detecção de HsGBA por *western blot*

Para a detecção da proteína HsGBA recombinante derivada de *C. reinhardtii* por *western blot*, 10 µL das mesmas frações descritas na seção 3.6.1 (solúvel e insolúvel, correspondentes ao choque térmico das linhagens D7 e G1 durante 30 e 60 min) foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 % empregando-se, como controle positivo, 400 ng de HsGBA purificada (Cerezyme[®], Genzyme). Em seguida, as amostras resolvidas foram transferidas para membrana de nitrocelulose para a revelação com anticorpo monoclonal contra HsGBA (SC-166407, Santa Cruz Biotechnology), por quimiluminescência.

3. 6. 3 Avaliação da atividade enzimática de HsGBA em extratos proteicos

O teste bioquímico para avaliação da atividade da HsGBA em extratos proteicos de *C. reinhardtii* foi executado conforme descrito por Holleran (1992). O método é baseado na hidrólise do substrato 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosídeo

(4-MUG) pela enzima HsGBA originando um produto fluorescente, a 4-metilumbeliferona (4-MU). Para o ensaio, 10 µL das mesmas frações descritas na seção 3.6.1 (solúvel e insolúvel, correspondentes ao choque térmico das linhagens D7 e G1 durante 30 e 60 min) foram incubados por 1 h a 37 °C com 0,5 mM do substrato 4-MUG em tampão citrato/fosfato de sódio a 0,1 M, pH 5,6, contendo 0,54 % de taurocolato de sódio, em um volume final de 100 µL. Em seguida, 1,25 mL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio a 0,2 M, pH 10,5, foi adicionado à reação a fim de interrompê-la e a fluorescência do produto foi medida em espectrofotômetro de fluorescência (RF-5301PC, Shimadzu; excitação a 360 nm; emissão a 450 nm). Concentrações conhecidas de 4-MU (0-500 nM) foram usadas para calibração. Como controle positivo, foram utilizados 10 µL de imiglucerase (Cerezyme[®], Genzyme) diluída 2.000 vezes.

3. 7 Verificação da expressão do gene repórter *gfp*

Para verificar a expressão de *gfp*, evidenciada pela detecção de fluorescência em análise por microscopia invertida, células das linhagens de *C. reinhardtii* transformadas geneticamente com o vetor pKS-*aph7*⁻-lox::*GFP* foram cultivadas e submetidas a choque térmico conforme descrito na seção 3.5.1. Após período de recuperação a 25 °C, uma alíquota da suspensão de células de cada linhagem foi analisada entre lâmina e lamínula em microscópio de fluorescência (*Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence*, Carl Zeiss Microscopy GmbH), utilizando-se filtro azul. Como controle negativo, foram analisadas células de *C. reinhardtii* transformadas com o plasmídeo pKS-*aph7*⁻-lox::*HsGBA*.

4. Resultados

Para a expressão do gene codificador da HsGBA a partir do genoma nuclear de *C. reinhardtii* foram propostas diversas etapas, elencadas na seção 2.2. A seguir, estão relatados os principais resultados obtidos na concretização desses objetivos.

4. 1 Adaptação de *HsGBA* e *gfp* a plasmídeo de expressão em *C. reinhardtii*

A sequência nucleotídica de *HsGBA* foi projetada com códons otimizados para expressão nuclear em *C. reinhardtii* a partir da sequência de cDNA da glicocerebrosidase humana, obtida no GenBank (NM_001005741.1), seguindo-se a recomendação de diversos autores que observaram a necessidade de adaptação de códons para um aumento dos níveis de expressão de proteínas heterólogas (Potvin e Zhang, 2010; Gong *et al.*, 2011; Rosales-Mendoza *et al.*, 2012). Após a adição de sítios de restrição para as enzimas XhoI e BamHI, visando à adaptação de *HsGBA* no vetor pHsp70A/RbcS2-*cgLuc*, a sequência resultante, com 1.623 pb (Figura 6), foi sintetizada e clonada no vetor pUC57 (GenScript USA Inc.).

A

> Chlamy_HsGBA

```
CTCGAGATCGAGTTCAGTCAGCAGCCAGCCGCGAGGAGTGCCCCAAGCCCTGAGCCGCGTGAGCATCATCGCCGGCAGCCTGACCGGCC
TGCTGCTGCTGCAGGCCGTGAGCTGGGCCAGCGGCCGCCGCCCTGCATCCCCAAGAGCTTCGGCTACAGCAGCGTGGTGTGCGTGTG
CAACGCCACCTACTGCGACAGCTTCGACCCCCACCTTCCCCGCCCTGGGCACCTTCAGCCGCTACGAGAGCACCAGCGAGCGGCCGC
CGCATGGAGCTGAGCATGGGCCCATCCAGGCCAACCACACCGGCACCGCCCTGCTGCTGACCCCTGCAGCCCGAGCAGAAGTTCAGAG
AGGTGAAGGGCTTCGGCGGCCCATGACCGACGCCGCCGCCCTGAACATCTGGCCCTGAGCCCCCGCCAGAACCTGCTGCTGAA
GAGTACTTCAGCGAGGAGGGCATCGGCTACAACATCATCGCGCTGCCATGGCCAGCTGCGACTTCAGCATCCGCACCTACACCTAC
GCCGACACCCCGCAGCAGCTTCAGCTGCACAACCTTCAGCCTGCCGAGGAGGACACCAAGCTGAAGATCCCCCTGATCCACCGCGCC
TGCAGCTGGCCAGGCCCGCCGTGAGCCTGCTGGCCAGCCCTGGACCAGCCCACTGGCTGAAGACCAACGGCGCCGTGAACGGCAA
GGGCAGCCTGAAGGGCCAGCCCGGCACATCTACCACCAGACCTGGGCCCGCTACTTCGTGAAGTTCCTGGACGCCCTACGCCGAGCAC
AAGCTGCAGTTCCTGGGCCGTGACCGCCGAGAACGAGCCAGCGCCGCCCTGCTGAGCGGCTACCCCTTCCAGTGCCCTGGGCTTACCC
CCGAGCACCAGCGGACTTCATCGCCCGGACCTGGGCCCACTGGCCCAACAGCACCACCAACCGTGCAGCCTGCTGATGCTGGA
CGACCGCCCTGCTGCTGCCCACTGGGCCAAGGTGGTCTGACCCAGCCCGAGCCGCAAGTACGTGCAGGCATCGCCGTGCAC
TGGTACCTGGACTTCTGGCCCCGCCAAGGCCACCTGGGCGAGACCCACCGCCTGTTCCCAACACCATGCTGTTGCCAGCGAGG
CCTGCGTGGGCAGCAAGTTCCTGGGAGCAGAGCGTGCACCTGGGCAGCTGGGACCGCGGCATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACC
CCTGCTGTACCAAGTGGTGGGCTGGACCGACTGGAACCTGGCCCTGAACCCGAGGGCGGCCCACTGGGTGGCAACTTCGTGGAC
AGCCCCATCATCGTGGACATCACCAGGACACCTTCTACAAGCAGCCCATGTTCTACCACTGGGCCACTTCAGCAAGTTCATCCCCG
AGGGCAGCCAGCGCTGGGCCCTGGTGGCCAGCCAGAAGAACGACCTGGACGCCGTGGCCCTGATGCACCCCGACGGCAGCGCCGTGGT
GGTGGTGTGAACCGCAGCAGCAAGGACCTGCCCTGACCATCAAGGACCCCGCCGTGGGCTTCCTGGAGACCATCAGCCCCGGCTAC
AGCATCCACACCTAAGTGTGGCGCCAGTAAGGATCC
```

B

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```
HsGBA_cDNA      MEFSSPSREECPKPLSRVSI MAGSLTGLLLLQAVSWASGARPCIPKSFYSSVVCV 60
Chlamy_HsGBA    MEFSSPSREECPKPLSRVSI MAGSLTGLLLLQAVSWASGARPCIPKSFYSSVVCV 60
*****

HsGBA_cDNA      YCDFPPTFFPALGTFSRYESTRSGRMELSMGPIQANHTGTGLLLTQPEQKFQVKGF 120
Chlamy_HsGBA    YCDFPPTFFPALGTFSRYESTRSGRMELSMGPIQANHTGTGLLLTQPEQKFQVKGF 120
*****

HsGBA_cDNA      GGAMTDAALNILALSPPAQNLLLSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDD 180
Chlamy_HsGBA    GGAMTDAALNILALSPPAQNLLLSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDD 180
*****

HsGBA_cDNA      FQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRVSVLLASPWTSPWLKTNGAVNGKGS LKGQP 240
Chlamy_HsGBA    FQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRVSVLLASPWTSPWLKTNGAVNGKGS LKGQP 240
*****

HsGBA_cDNA      GDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQ RDFIA 300
Chlamy_HsGBA    GDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQ RDFIA 300
*****

HsGBA_cDNA      RDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGI AVHWYLD FLAPAK 360
Chlamy_HsGBA    RDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGI AVHWYLD FLAPAK 360
*****

HsGBA_cDNA      ATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIIITNLLYHVVGWTDW 420
Chlamy_HsGBA    ATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIIITNLLYHVVGWTDW 420
*****

HsGBA_cDNA      NLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQK 480
Chlamy_HsGBA    NLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQK 480
*****

HsGBA_cDNA      NDLDVAALMHPDGS AVVVV LNRSSKDVPLTIKDP AVGFLETISP GYSIH TYLWRRQ 536
Chlamy_HsGBA    NDLDVAALMHPDGS AVVVV LNRSSKDVPLTIKDP AVGFLETISP GYSIH TYLWRRQ 536
*****
```

C

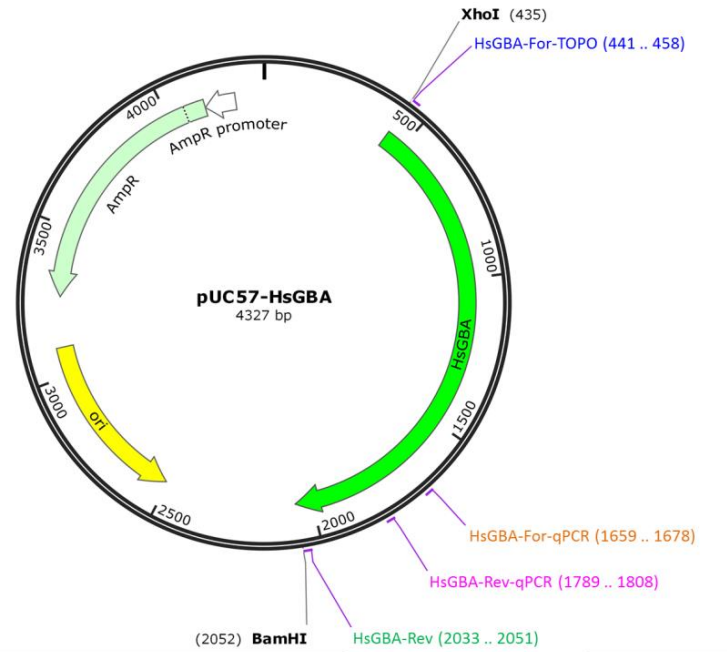


Figura 6: Resultados da projeção da sequência de *HsGBA* para expressão em *C. reinhardtii*. (A) Quadro aberto de leitura da *HsGBA* artificial com códons otimizados para expressão nuclear em *C. reinhardtii*. Os nucleotídeos que codificam o peptídeo-sinal (com 39 ou 19 aminoácidos) estão representados em vermelho, enquanto os correspondentes à proteína madura estão em preto. Os dois potenciais códons de início de tradução (**ATG**) estão sinalizados com uma caixa. Sítios de restrição adicionados para *XhoI* (em amarelo) e *BamHI* (em cinza) estão indicados. Também estão destacadas as regiões de anelamento dos *primers* *HsGBA-For-TOPO* (em azul), *HsGBA-Rev* (em verde), *HsGBA-For-qPCR* (em laranja) e *HsGBA-Rev-qPCR* (em rosa). (B) Alinhamento das sequências peptídicas deduzidas do cDNA original humano da GBA (*HsGBA_cDNA*) e da versão otimizada para expressão em *C. reinhardtii* (*Chlamy_HsGBA*). Os aminoácidos equivalentes ao peptídeo-sinal (com 39 ou 19 aminoácidos) estão representados em vermelho, enquanto os correspondentes à proteína madura estão em preto. O início de cada um dos possíveis peptídeos-sinais está sinalizado com uma caixa. (C) Mapa do vetor *pUC57-HsGBA* criado com o *software SnapGene* 2.8.1 a partir da sequência nucleotídica do vetor *pUC57* (GenScript) e da sequência projetada de *HsGBA*. Além do gene de interesse (*HsGBA*), estão representados o marcador de seleção para ampicilina (*AmpR*), o sítio da origem de replicação (*ori*), sítios de restrição para *XhoI* e *BamHI* e regiões de anelamento dos *primers* *HsGBA-For-TOPO*, *HsGBA-Rev*, *HsGBA-For-qPCR* e *HsGBA-Rev-qPCR*.

Após a digestão de pUC57-*HsGBA* com as enzimas XhoI e BamHI, o fragmento de 1.617 pb correspondente ao gene *HsGBA* foi transferido para o vetor pHsp70A/RbcS2-*cgLuc* clivado com as mesmas enzimas, posicionando-se a região codificadora entre o promotor quimérico HSP70A/RBCS2 com o primeiro íntron do gene *RBCS2* de *C. reinhardtii* e a região 3'-UTR desse mesmo gene. Com isto, o gene repórter *cgLuc* original do plasmídeo pHsp70A/RbcS2-*cgLuc* foi substituído pelo gene de interesse *HsGBA*, resultando no vetor pHsp70A/RbcS2-*HsGBA* (Figura 7).

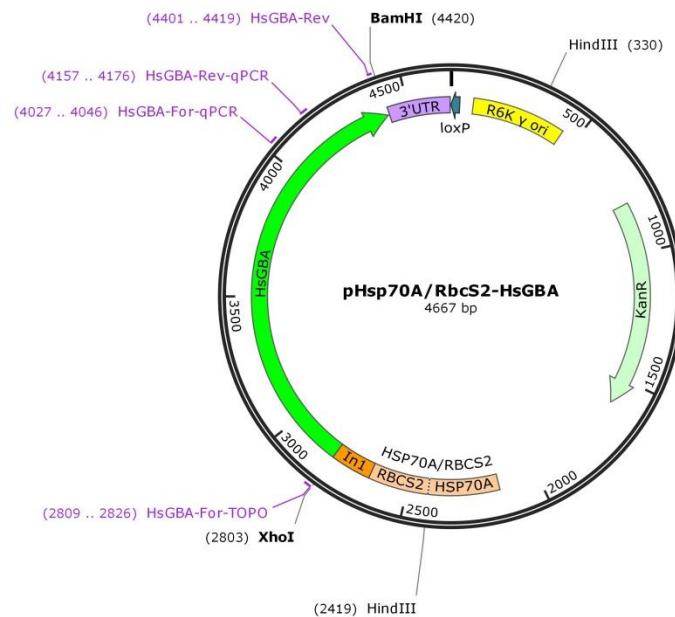


Figura 7: Mapa do vetor pHsp70A/RbcS2-*HsGBA* criado com o *software SnapGene* 2.8.1 a partir das seqüências nucleotídicas de pUC57-*HsGBA* (Figura 6) e pHsp70A/RbcS2-*cgLuc*. Substituindo o gene *cgLuc* no vetor pHsp70A/RbcS2-*cgLuc*, *HsGBA* está sob controle do promotor quimérico HSP70A/RBCS2 e da 3'UTR do gene *RBCS2* de *C. reinhardtii*. Também estão representados no mapa o marcador de seleção para canamicina (KanR), a origem de replicação (R6K γ ori), o sítio *loxP* para recombinação pelo sistema *Cre/lox*, os sítios de restrição para XhoI, BamHI e HindIII e as regiões de anelamento dos *primers* HsGBA-For-TOPO, HsGBA-Rev, HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR. HSP70A/RBCS2: promotor quimérico contendo o promotor da proteína de choque térmico 70A (HSP70A) e o promotor da subunidade menor da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RBCS2); In1: íntron 1 do gene *RBCS2*.

Para avaliar a expressão do gene repórter *gfp* em *C. reinhardtii*, o plasmídeo pHsp70A/RbcS2-*GFP* (Figura 8) foi construído de forma semelhante, com a transferência do fragmento de 723 pb do vetor pKSc*GFP* para o plasmídeo pHsp70A/RbcS2-*cgLuc*, ambos clivados com as enzimas XhoI e BamHI.

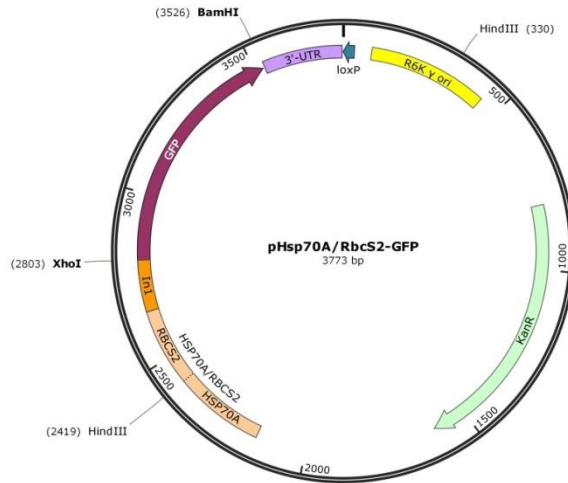


Figura 8: Mapa do vetor pHsp70A/RbcS2-*GFP* criado com o *software SnapGene 2.8.1* a partir das sequências nucleotídicas de pKSc*GFP* e pHsp70A/RbcS2-*cgLuc*. Substituindo o gene *cgLuc* no vetor pHsp70A/RbcS2-*cgLuc*, *gfp* está sob controle do promotor quimérico HSP70A/RBCS2 e da 3'-UTR do gene *RBCS2* de *C. reinhardtii*. Também estão representados no mapa o marcador de seleção para canamicina (KanR), a origem de replicação (R6K γ ori), o sítio *loxP* para recombinação pelo sistema Cre/*lox* e os sítios de restrição para XhoI, BamHI e HindIII. HSP70A/RBCS2: promotor quimérico contendo o promotor da proteína de choque térmico 70A (HSP70A) e o promotor da subunidade menor da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RBCS2); In1: íntron 1 do gene *RBCS2*.

Células de *E. coli* PIR1 foram transformadas geneticamente com os dois plasmídeos resultantes, isto é, pHsp70A/RbcS2-*HsGBA* e pHsp70A/RbcS2-*GFP*. Para a confirmação das clonagens de *HsGBA* e *gfp* no vetor pHsp70A/RbcS2-*cgLuc*, preparações plasmidiais obtidas de diferentes linhagens de células transformadas foram submetidas à digestão com enzimas de restrição, seguida por eletroforese em gel de agarose. Conforme ilustrado na Figura 9, obteve-se pleno êxito em ambas as

construções, com fragmentos correspondentes às bandas de ~1.600 pb (HsGBA, canaletas H1 e H6 em “A”) e de ~700 pb (*gfp*, canaleta G1 em “B”).

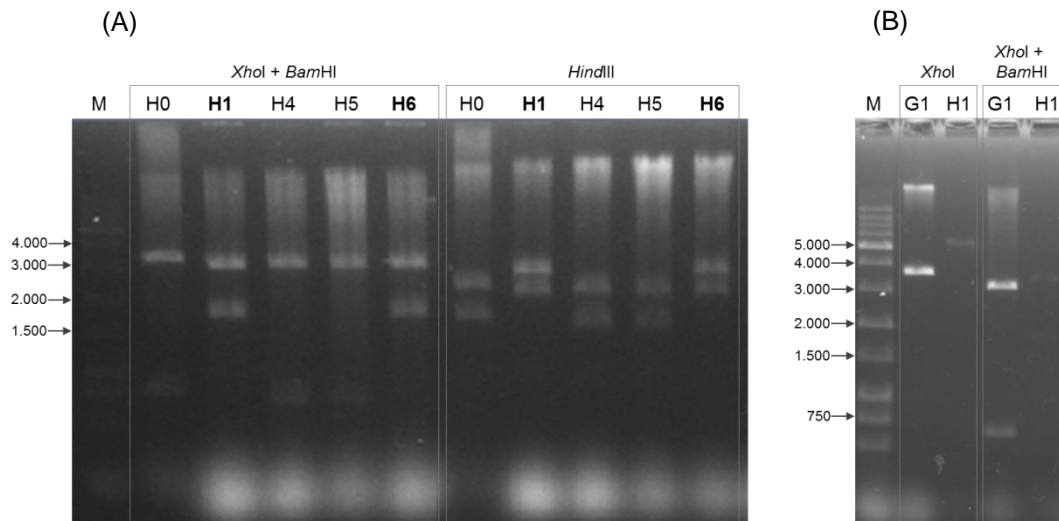
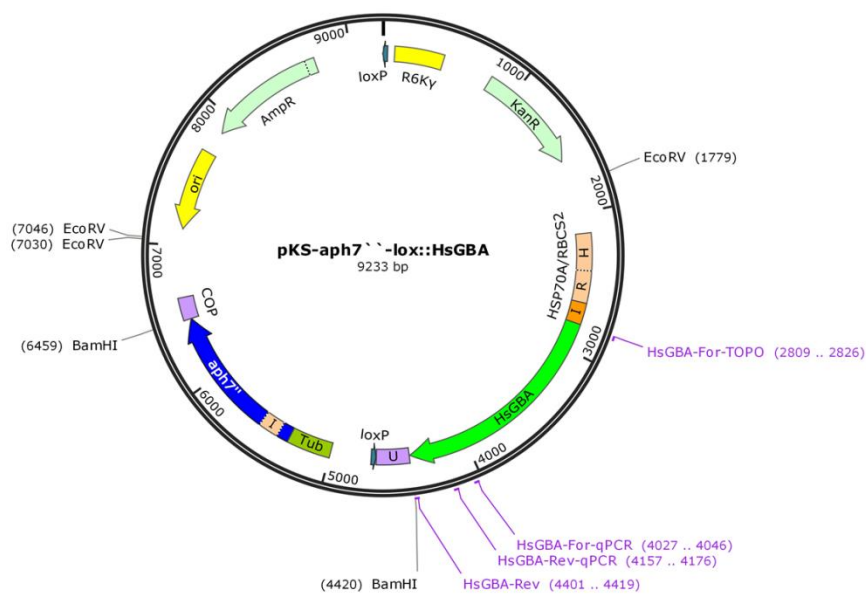


Figura 9: Comprovação da clonagem de *HsGBA* e *gfp* no vetor pHsp70A/RbcS2-*cgLuc*. Preparações plasmidiais de diferentes linhagens de *E. coli* PIR1 transformadas com pHsp70A/RbcS2-*HsGBA* (H0-H6) e pHsp70A/RbcS2-*GFP* (G1) foram tratadas com endonucleases e o produto da digestão foi resolvido por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com SYBR-Gold. (A) O padrão de bandas esperado (1.617 e 3.050 pb, resultante da digestão com XhoI e BamHI, grupo à esquerda; 2.578 e 2.089 pb, resultante da digestão com HindIII, grupo à direita) confirma a clonagem de *HsGBA* para as linhagens H1 e H6. (B) O padrão de bandas obtido pela digestão com XhoI (à esquerda) confirma clonagem de *gfp* para a linhagem G1 (3.773 pb) e de *HsGBA* para a linhagem H1 (4.667 pb), resultados corroborados por nova digestão com XhoI e BamHI (à direita; bandas de 723 e 3.050 pb para G1 e 1.617 e 3.050 pb para H1). Tanto em (A) como em (B), as diferenças observadas entre bandas de mesmo tamanho podem ser decorrentes do efeito do SYBR-Gold, observado também em outros experimentos. M: marcador de tamanhos de fragmentos de DNA, em pb, *Ladder 1 kb* (Ludwig Biotec).

Para a construção dos vetores de expressão em *C. reinhardtii*, os plasmídeos pHsp70A/RbcS2-*HsGBA* e pHsp70A/RbcS2-*GFP* foram recombinados *in vitro* por ação da enzima Cre-recombinase com o vetor pKS-*aph7*-lox, o qual contém o gene

aph7⁺ que confere resistência à higromicina B. Essa recombinação sítio-específica resultou no vetor pKS-*aph7⁺*-lox::*HsGBA*, com cassetes em *tandem* para expressão do gene de interesse *HsGBA* e do marcador de seleção *aph7⁺* em *C. reinhardtii* (Figura 10A). Da mesma forma, o vetor pKS-*aph7⁺*-lox::*GFP* possui cassetes em *tandem* para expressão, em *C. reinhardtii*, do gene repórter *gfp* e do marcador de seleção *aph7⁺* (Figura 10B).

(A)



(B)

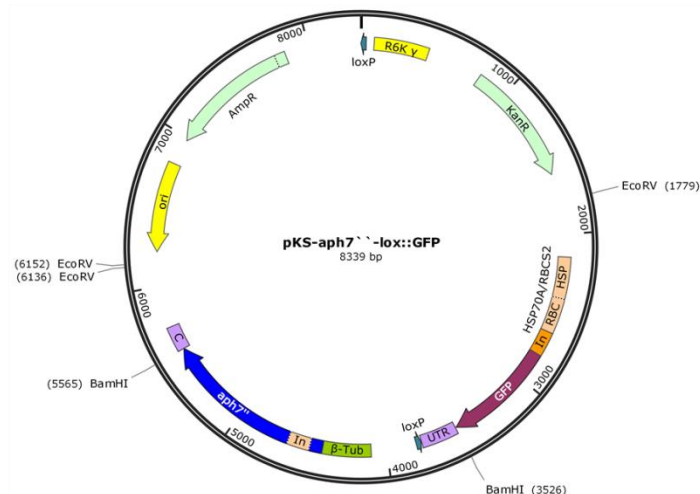


Figura 10: Mapas dos vetores pKS-*aph7⁺*-lox::*HsGBA* e pKS-*aph7⁺*-lox::*GFP* criados com o *software SnapGene 2.8.1* a partir das sequências nucleotídicas dos plasmídeos recombinados. Os vetores resultantes da recombinação pelo sistema Cre/*lox* entre pKS-*aph7⁺*-lox e pHsp70A/RbcS2-*HsGBA* ou pHsp70A/RbcS2-*GFP* contêm cassetes em

tandem para expressão, em *C. reinhardtii*, do marcador de seleção *aph7*⁺ e do gene de interesse *HsGBA* (A) ou do gene repórter *gfp* (B). Também estão representados, em cada mapa, a origem de replicação R6K γ para manutenção em células de *E. coli* PIR1 (Invitrogen), às quais KanR confere resistência à canamicina, a origem de replicação (*ori*) para manutenção em células de *E. coli* DH5 α , às quais AmpR confere resistência à ampicilina, os dois sítios *loxP* e os sítios de restrição para *Bam*HI e *Eco*RV. As regiões de anelamento dos *primers* HsGBA-For-TOPO, HsGBA-Rev, HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR estão indicadas em (A). HSP70A/RBCS2: promotor quimérico contendo o promotor da proteína de choque térmico 70A (H ou HSP) e o promotor da subunidade menor da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (R ou RBC); I ou In: íntron 1 do gene *RBCS2*; U ou UTR: região 3'-não traduzida do gene *RBCS2*; Tub ou β -Tub: promotor da β 2-tubulina; COP ou C: região 3'-não traduzida da clamiopsina-1.

Células de *E. coli* DH5 α foram transformadas geneticamente com os produtos das recombinações e distribuídas em placas contendo 50 mg/L de canamicina. Como os plasmídeos resultantes contêm as características dos dois plasmídeos usados na recombinação, pHsp70A/RbcS2-*HsGBA*/pHsp70A/RbcS2-*GFP* (resistência à canamicina e origem de replicação R6K γ para manutenção somente em células PIR1) e pKS-*aph7*⁺-*lox* (resistência à ampicilina e origem de replicação para manutenção apenas em células DH5 α), somente células de *E. coli* DH5 α contendo os plasmídeos recombinados puderam se desenvolver em presença de canamicina. Conforme ilustrado na Figura 11, a recombinação foi comprovada pela digestão com *Bam*HI de preparações plasmidiais de células transformadas com os vetores recombinados, seguida por eletroforese em gel de agarose.

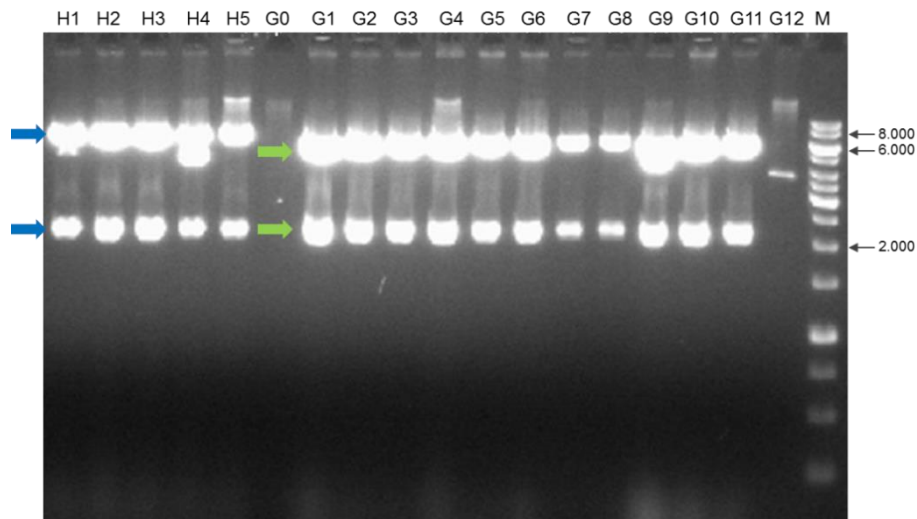


Figura 11: Comprovação do sucesso nas recombinações *in vitro* pelo sistema Cre/lox entre os plasmídeos pHsp70A/RbcS2-*HsGBA* ou pHsp70A/RbcS2-*GFP* e pKS-*aphT*⁻-lox. Preparações plasmidiais de diferentes linhagens de *E. coli* transformadas com pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA* (H1-H5) e pKS-*aphT*⁻-lox::*GFP* (G0-G12) foram clivadas com BamHI e o produto da digestão foi resolvido por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídeo. O padrão de bandas esperado (2.039 e 7.194 pb, setas azuis) confirma a presença do plasmídeo recombinado nas 5 linhagens transformadas com pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA* testadas (H1-H5). Da mesma forma, o padrão de bandas obtido a partir das linhagens G1-G11 (2.039 e 6.300 pb, setas verdes) permite inferir que as mesmas foram transformadas com o plasmídeo recombinado pKS-*aphT*⁻-lox::*GFP*. M: marcador de tamanhos de fragmentos de DNA, em pb, *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific).

4. 2 Transformação genética de *C. reinhardtii*

Células da linhagem de *C. reinhardtii* CC-400 cw15 mt+ foram transformadas geneticamente por eletroporação com os vetores de expressão pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA* e pKS-*aphT*⁻-lox::*GFP* nas formas circular e linearizada. Os plasmídeos foram linearizados pela digestão com EcoRV. Além da linearização, a digestão dos plasmídeos com EcoRV, proposta por Heitzer e Zschoernig (2007), permitiu suas fragmentações, de modo que os segmentos de 5.251 pb e 4.357 pb resultantes, respectivamente, da

digestão de pKS-*aph7*⁻-lox::HsGBA e pKS-*aph7*⁻-lox::GFP, contêm apenas os cassetes do gene de interesse (ou repórter) e o marcador de seleção para expressão em *C. reinhardtii* (Figura 12).

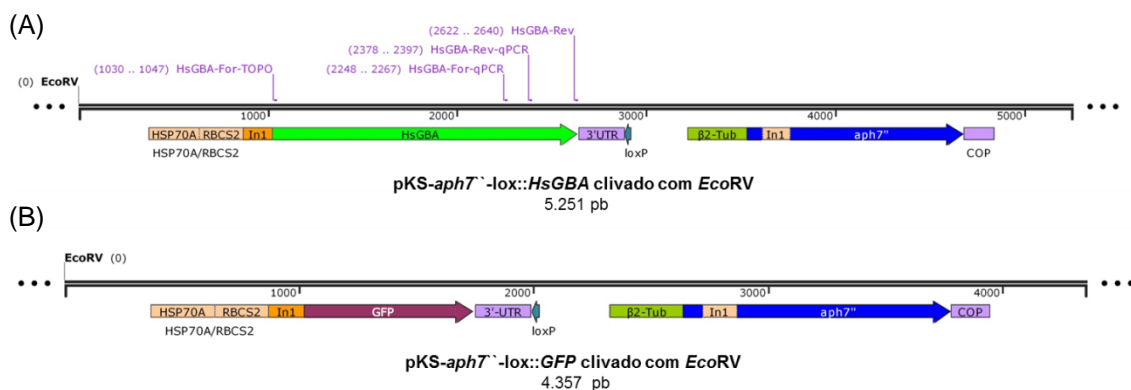


Figura 12: Mapas dos fragmentos dos vetores pKS-*aph7*⁻-lox::HsGBA e pKS-*aph7*⁻-lox::GFP, contendo exclusivamente os cassetes de expressão em *tandem*, criados com o software SnapGene 2.8.1 a partir das sequências nucleotídicas dos respectivos plasmídeos. (A) Fragmento de 5.251 pb resultante da digestão de pKS-*aph7*⁻-lox::HsGBA com EcoRV. As regiões de anelamento dos *primers* HsGBA-For-TOPO, HsGBA-Rev, HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR estão indicadas no mapa. (B) Fragmento de 4.357 pb resultante da digestão de pKS-*aph7*⁻-lox::GFP com EcoRV. HSP70A/RBCS2: promotor quimérico contendo o promotor da proteína de choque térmico 70A (HSP70A) e o promotor da subunidade menor da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RBCS2); In1: íntron 1 do gene *RBCS2*; 3'-UTR: região 3'-não traduzida do gene *RBCS2*; beta2-Tub: promotor da beta2-tubulina; COP: região 3'-não traduzida da clamiopsina-1.

Conforme apresentado na Figura 13, após 7 dias de incubação entre 23 e 25 °C, com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro e sob seleção com 10 mg/L de higromicina B, células de *C. reinhardtii* transformadas com o plasmídeo pKS-*aph7*⁻-lox::HsGBA linearizado originaram um número de colônias muito superior ao obtido a partir da transformação com o plasmídeo íntegro. Esse resultado, descrito por outros autores (León-Bañares *et al.*, 2004), também foi observado para células transformadas com o vetor pKS-*aph7*⁻-lox::GFP (não mostrado).

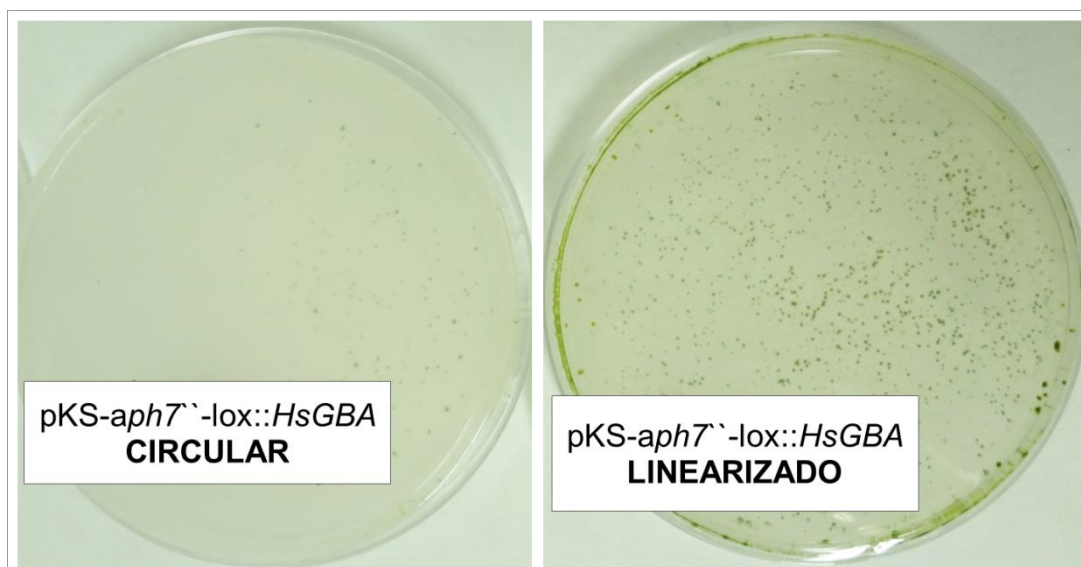


Figura 13: Transformação genética de *C. reinhardtii* com pKS-*aph7`-lox::HsGBA*. Após 7 dias de incubação, o número de colônias originadas a partir de células transformadas com o plasmídeo linearizado (à direita) foi muito maior que o obtido na transformação com o plasmídeo íntegro (forma circular).

Como resultado, foram selecionadas 36 colônias de *C. reinhardtii* resultantes da transformação com pKS-*aph7`-lox::HsGBA* linearizado (Figura 13) e 36 colônias originadas pela transformação com pKS-*aph7`-lox::GFP*, também linearizado, estabelecendo-se culturas-estoque mantidas em meio TAP líquido e sólido sob seleção com 10 mg/L de higromicina B e incubadas sob refrigeração após a formação de colônias.

4. 3 Identificação de linhagens de *C. reinhardtii* *HsGBA*-positivas

Análises por PCR de amostras de DNA das 36 linhagens transformadas com pKS-*aph7`-lox::HsGBA* demonstram a integração de *HsGBA* no genoma de cinco delas (F5, F6, F9, G1 e G5), isto é, 14 % das linhagens avaliadas. Como se pode observar na Figura 14, a resolução dos produtos das PCRs a partir dessas cinco linhagens por eletroforese em gel de agarose gerou bandas de tamanho equivalente ao quadro aberto de leitura completo de *HsGBA* (1.623 pb), conforme esperado com o emprego dos *primers* *HsGBA-For-TOPO* e *HsGBA-Rev* (regiões de anelamento destacadas,

respectivamente, em azul e verde na Figura 6). Bandas de mesmo tamanho foram geradas a partir da amplificação do controle positivo (plasmídeo pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA*), não sendo observadas para amostras correspondentes às linhagens *wild-type* (A5 e A7) e transformadas com pKS-*aphT*⁻-lox::*GFP* (B3, C12 e D7), usadas como controles negativos.

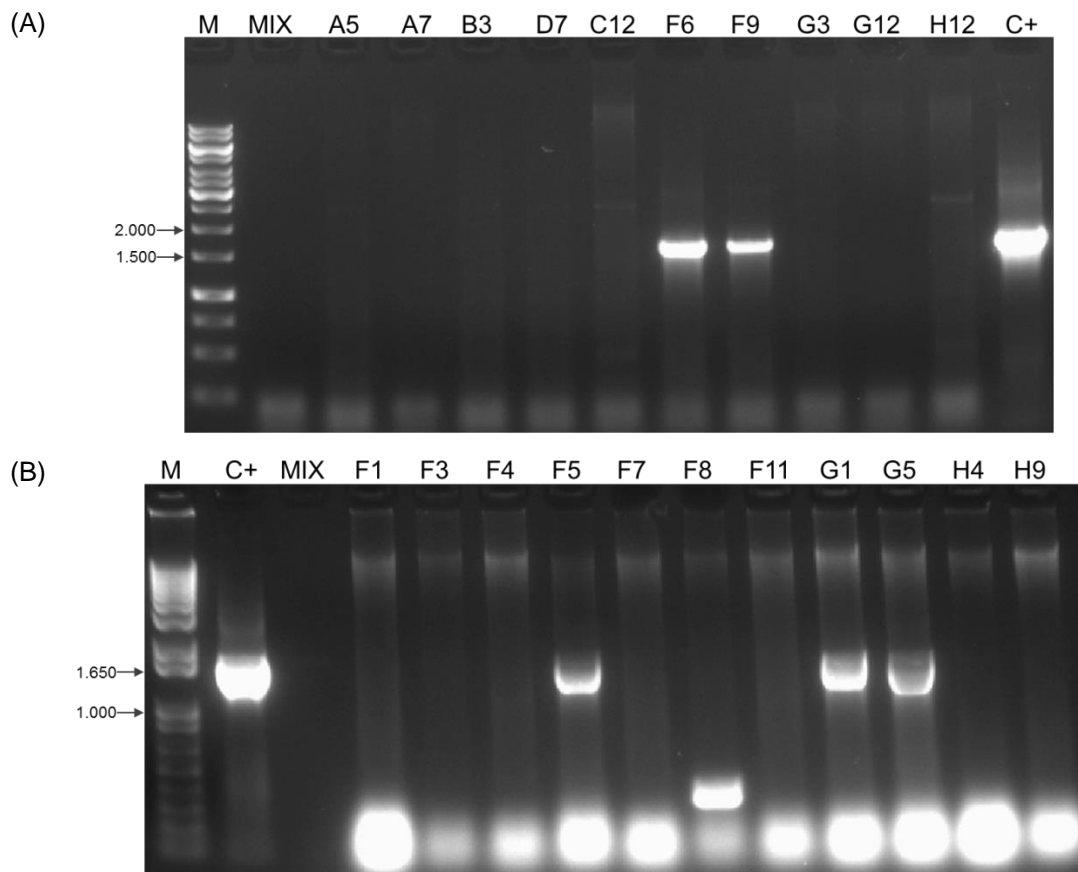


Figura 14: Integração de *HsGBA* no genoma de linhagens de *C. reinhardtii* transformadas com pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA* demonstrada por PCR. A resolução de produtos de PCRs por eletroforese em gel de agarose a 1 % corado com brometo de etídeo, demonstra a integração de *HsGBA* no genoma das linhagens F5, F6, F9, G1 e G5, para as quais se observam bandas de, aproximadamente, 1.620 pb, tamanho equivalente ao quadro aberto de leitura completo de *HsGBA*. (A) F6, F9, G3, G12 e H12 correspondem a amostras de DNA extraído das respectivas linhagens, todas transformadas com pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA*. Amostras de DNA de linhagens *wild-type* (A5 e A7) e transformadas com pKS-*aphT*⁻-lox::*GFP* (B3, C12 e D7), assim como a mistura de reação sem a adição de DNA (MIX), foram usadas como controles

negativos. Como controle positivo da reação (C+), foi utilizado DNA do plasmídeo pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA* como molde. M: marcador de tamanhos de fragmentos de DNA, em pb, *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific). (B) F1-H9 correspondem a amostras de DNA extraído dessas linhagens, transformadas com pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA*. A mistura de reação sem adição de DNA (MIX) foi utilizada como controle negativo, enquanto DNA do plasmídeo pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA* foi usado como controle positivo da reação (C+). M: marcador de tamanhos de fragmentos de DNA, em pb, *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

A integração de *HsGBA* no genoma das linhagens F5, F6, F9, G1 e G5 foi também confirmada por PCR com o emprego de um segundo par de *primers*, HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR, que levam à amplificação de uma região de 150 pb do gene *HsGBA* (regiões de anelamento destacadas, respectivamente, em laranja e rosa na Figura 6). Conforme a Figura 15, quando o produto das PCRs foi resolvido por eletroforese em gel de agarose, a presença de uma banda equivalente a esse tamanho foi observada para amostras de DNA das cinco linhagens e para o controle positivo (pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA*), não sendo visualizada nos controles negativos, isto é, as amostras correspondentes às linhagens *wild-type* (A5) e transformadas com pKS-*aphT*⁻-lox::*GFP* (C12 e D7).

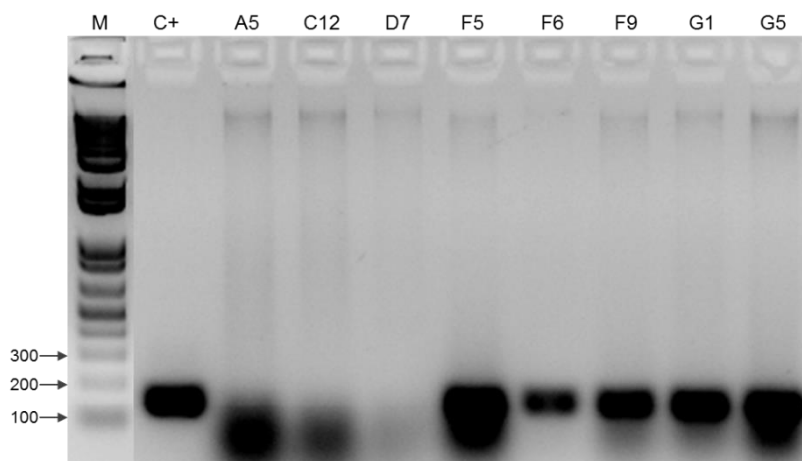


Figura 15: Confirmação da integração de *HsGBA* no genoma de linhagens de *C. reinhardtii* transformadas com pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA* por PCR. A resolução de produtos de PCRs por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo permitiu confirmar a integração de *HsGBA* no genoma das linhagens F5, F6, F9, G1 e G5, nas quais se observam bandas de 150 pb, tamanho do *amplicon* gerado com os

primers HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR. A mesma banda também é observada para o plasmídeo pKS-*aph7*⁻-lox::*HsGBA*, usado como controle positivo da reação (C+), mas não para amostras de linhagens *wild-type* (A5) e transformadas com pKS-*aph7*⁻-lox::*GFP* (C12 e D7), usadas como controles negativos. M: marcador de tamanhos de fragmentos de DNA, em pb, *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

4. 4 Identificação de linhagens de *C. reinhardtii* *gfp*-positivas

Tentativas preliminares de identificação de linhagens de *C. reinhardtii* *gfp*-positivas foram efetuadas por meio de análises por microscopia de fluorescência. Entretanto, não foram observadas diferenças nas intensidades de fluorescência entre as 36 linhagens transformadas com o plasmídeo pKS-*aph7*⁻-lox::*GFP* e linhagens transformadas com pKS-*aph7*⁻-lox::*HsGBA*, usadas como controles negativos.

Em virtude desses resultados preliminares negativos, PCRs foram realizadas para verificar a integração de *gfp* no genoma das linhagens de *C. reinhardtii* B3, C12 e D7, transformadas com pKS-*aph7*⁻-lox::*GFP*. Nos vários testes executados, a amplificação de *gfp* somente foi observada para o plasmídeo pKS-*aph7*⁻-lox::*GFP* usado como controle positivo da reação, não ocorrendo o mesmo para quaisquer das outras linhagens avaliadas (resultados não mostrados).

Os experimentos até então realizados com *gfp* tinham como objetivo a transformação de *C. reinhardtii* com um gene cuja expressão fosse fácil e rapidamente detectada, com vistas a validar os ensaios com *HsGBA* executados em paralelo. Entretanto, diante dos resultados satisfatórios obtidos com o gene de interesse, como a identificação das linhagens recombinantes de *C. reinhardtii* por PCR, os experimentos com *gfp* foram descontinuados, prosseguindo-se somente com análises de linhagens transformadas com *HsGBA*.

4. 5 Análises da presença de mRNA de *HsGBA* em *C. reinhardtii* por RT-PCR

O vetor pKS-*aph7*⁻-lox::*HsGBA* foi construído de forma a posicionar o gene *HsGBA* sob o controle do promotor quimérico HSP70A/RBCS2. Nesse promotor, HSP70A atua como ativador transcricional de RBCS2 quando induzido por choque

térmico, aumentando os níveis de expressão do gene de interesse conforme demonstrado por Schroda *et al.* (2000). Sendo assim, visando potencializar a transcrição de *HsGBA*, células de *C. reinhardtii* foram submetidas a um choque térmico a 40 °C por 1 h, seguido por um período de recuperação de 2 h a 25 °C, condições estabelecidas pelo grupo de Schroda para máxima atividade da arilsulfatase, quando o gene codificador da enzima estava sob controle do promotor HSP70A (Schroda *et al.*, 2000). Após extração de RNA e síntese de cDNA, a presença de mRNA de *HsGBA* nas cinco linhagens de *C. reinhardtii* identificadas como portadoras do transgene (F5, F6, F9, G1 e G5) foi avaliada qualitativamente por RT-PCR, empregando-se o gene *RBCS2* como referência.

A resolução dos produtos das RT-PCRs por eletroforese em gel de agarose demonstrou a expressão do gene *HsGBA* em nível de mRNA para as linhagens F6, F9 e G1, para as quais se observaram bandas de 150 pb, correspondentes ao produto de amplificação obtido com o par de *primers* *HsGBA-For-qPCR* e *HsGBA-Rev-qPCR*, conforme ilustrado na Figura 16. Para as linhagens F5 e G5, embora a integração de *HsGBA* tenha sido comprovada, a ausência de bandas por RT-PCR não permitiu afirmar a ocorrência de sua transcrição. Essa ausência de banda para a linhagem G5, assim como a fraca intensidade das bandas observadas para a linhagem F9, poderia ser decorrente de problemas no RNA extraído, uma vez que também não se observou amplificação do gene referência (*RBCS2*) para essas linhagens.

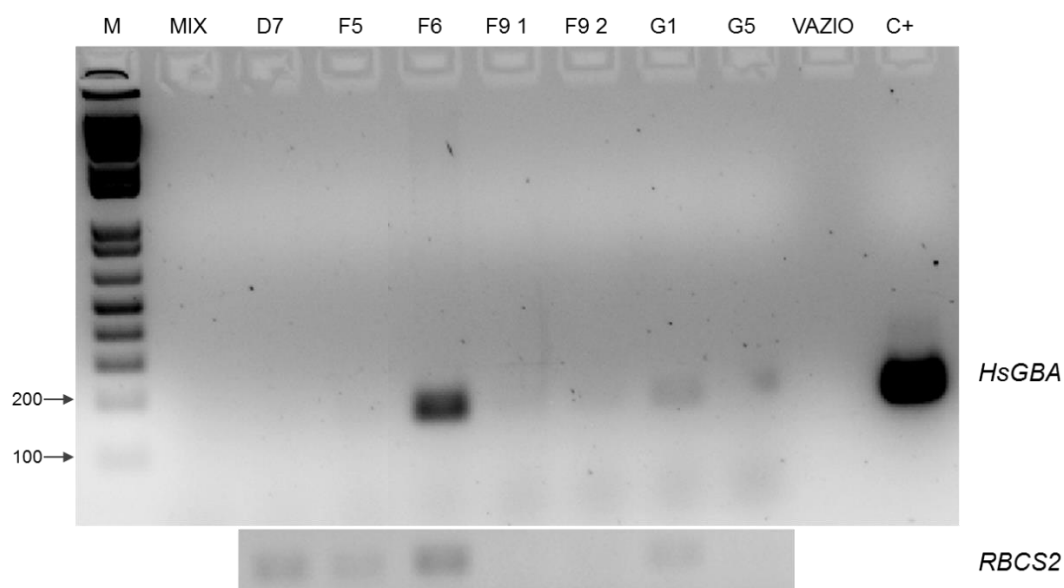


Figura 16: Comprovação da expressão de *HsGBA* em nível da presença momentânea de mRNA para linhagens de *C. reinhardtii* transformadas com *pKS-aph7⁻-lox::HsGBA*. A

resolução dos produtos de RT-PCRs por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo permitiu comprovar a presença de mRNA de *HsGBA* para as linhagens F6, F9 e G1, para as quais se observam bandas de 150 pb, tamanho do *amplicon* gerado com os *primers* HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR. A mistura de reação sem a adição de DNA (MIX) e amostra de linhagem transformada com pKS-*aph7*^{-lox::GFP} (D7) foram usadas como controles negativos, enquanto o plasmídeo pKS-*aph7*^{-lox::HsGBA} foi utilizado como controle positivo da reação (C+). F9 1 e F9 2 correspondem a amostras de cDNA obtidas a partir de diferentes inóculos da linhagem F9. O produto obtido pela amplificação do gene referência (*RBCS2*) com os *primers* CrRBCS2B-For e CrRBCS2B-Rev1 para cada linhagem testada é apresentado abaixo da imagem do gel. M: marcador de tamanhos de fragmentos de DNA, em pb, *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Para confirmar se os *amplicons* observados na Figura 16 realmente correspondiam a transcritos do gene *HsGBA*, os produtos de amplificação obtidos com os *primers* HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR a partir de cDNA das linhagens de *C. reinhardtii* F6 e G1 foram sequenciados empregando-se esse mesmo par de *primers*. Conforme alinhamento realizado com o *software Clustal Omega* (Sievers *et al.*, 2011), cujo resultado é apresentado na Figura 17A, o sequenciamento do *amplicon* está de acordo com a sequência de bases projetada para o gene *HsGBA* (Figura 6), comprovando que pelo menos parte do gene (região de 150 pb) está sendo transcrita corretamente (Figura 17B).

(A)

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

HsGBA-Rev-qPCR      ATCACCAACCTGCTGTACCACGTGGTGGGCTGGACCGACTGGAACCTGGCCCTGAACCCC
HsGBA-For-qPCR      -----CTGGCCCTGAACCCC
HsGBA                ATCACCAACCTGCTGTACCA CGTGGTGGGCTGGACCGACTGGAACCTGGCCCTGAACCCC
                               *****

HsGBA-Rev-qPCR      GAGGGCGGCCCAACTGGGTGCGCAACTTCGTGGACAGCCCCAT-----
HsGBA-For-qPCR      GAGGGCGGCCCAACTGGGTGCGCAACTTCGTGGACAGCCCCATCATCGTGGACATCACC
HsGBA                GAGGGCGGCCCAACTGGGTGCGCAACTTCGTGGACAGCCCCATCATCGTGGACATCACC
                               *****

HsGBA-Rev-qPCR      -----
HsGBA-For-qPCR      AAGGACACCTTCTACAAGCAGCCCATGTTT
HsGBA                AAGGACACCTTCTACAAGCAGCCCATGTTT

```

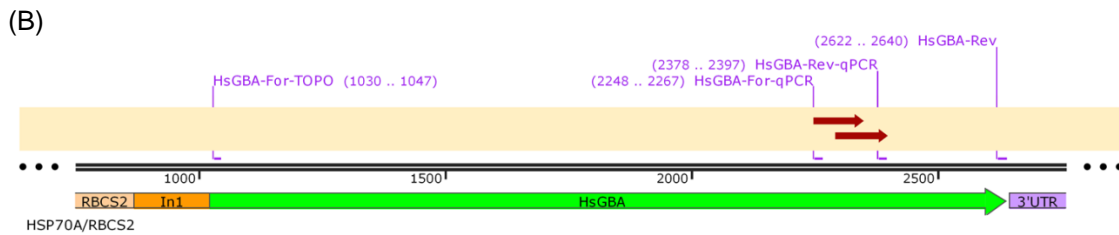


Figura 17: Comprovação da expressão de *HsGBA* pelo sequenciamento dos produtos das RT-PCRs correspondentes às linhagens de *C. reinhardtii* F6 e G1. (A) O alinhamento entre parte da sequência projetada para *HsGBA* (150 pb) e as sequências obtidas com os *primers forward* (HsGBA-For-qPCR) e *reverse* (HsGBA-Rev-qPCR) pelo sequenciamento dos produtos das RT-PCRs demonstra que os *amplicons* correspondem, de fato, a transcritos do gene *HsGBA*. As regiões de anelamento dos *primers* HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR estão destacadas, respectivamente, em laranja e em rosa na sequência de *HsGBA*. Os asteriscos representam regiões de total identidade de bases entre as três sequências alinhadas. (B) Mapa de parte do cassete de expressão de *HsGBA* criado com o *software SnapGene 2.8.1* a partir da sequência nucleotídica de pKS-*aphT*^{-lox}::*HsGBA* e das sequências identificadas em (A) como HsGBA-Rev-qPCR e HsGBA-For-qPCR, evidenciando a região sequenciada de 150 pb, correspondente aos produtos das RT-PCRs. A sobreposição das sequências obtidas com os *primers* HsGBA-For-qPCR (seta vermelha inferior) e HsGBA-Rev-qPCR (seta vermelha superior) e a região de 150 pb de *HsGBA* demonstra que pelo menos essa parte do gene está sendo transcrita corretamente.

4. 6 Definição de tratamento e tempo de máximo acúmulo de mRNA de *HsGBA* em *C. reinhardtii*

Conforme apresentado na seção anterior, os ensaios para análises da expressão do gene *HsGBA* em *C. reinhardtii* foram realizados com a aplicação de choque térmico de acordo com as condições estabelecidas por Schroda *et al.* (2000) para máxima atividade da arilsulfatase, codificada pelo gene *ARS* sob o controle do promotor HSP70A. Tendo em vista os níveis de expressão aparentemente baixos evidenciados por RT-PCR (Figura 16) e diante dos resultados negativos para a imunodeteção da proteína glicocerebrosidase sob as mesmas condições de cultivo (dados não mostrados), novos parâmetros foram testados com o objetivo de otimizar a indução da expressão de *HsGBA*, determinando-se o tempo em que ocorre o maior acúmulo de mRNA após o

choque térmico. Assim, um experimento de *time-course* foi conduzido com vistas a avaliar diferentes tempos de exposição a 40 e a 25 °C como tempo de recuperação do choque. Os resultados permitiram demonstrar qualitativamente, mediante RT-PCR seguida por eletroforese em gel de agarose, que a condição até então utilizada, isto é, choque térmico por 1 h a 40 °C seguido por período de recuperação a 25 °C por 2 h, não era a melhor para o máximo acúmulo de mRNA de *HsGBA*, uma vez que, conforme resultados apresentados na Figura 18, maiores níveis de *steady-state* mRNA de *HsGBA* ocorreram com a submissão de células da linhagem G1 a 40 °C por 30 e 60 min, sem incubação das células a 25 °C para recuperação das mesmas.

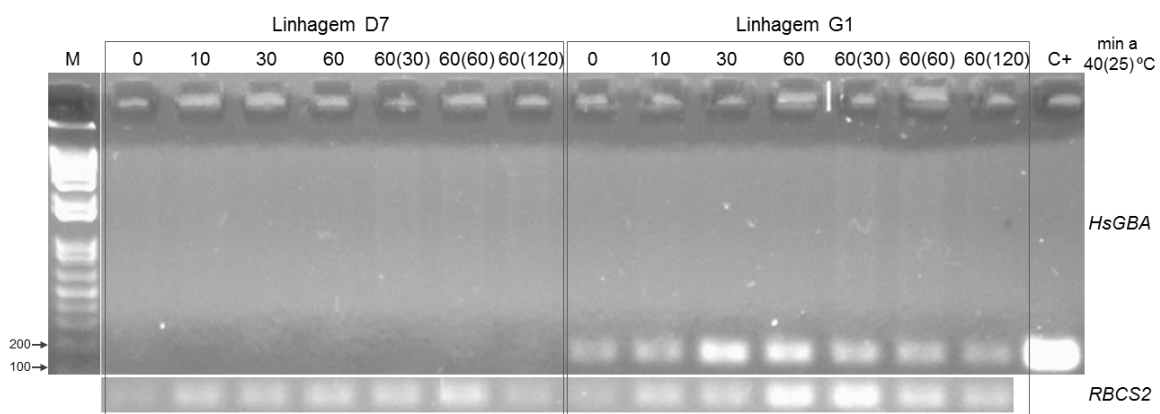


Figura 18: Otimização das condições de choque térmico e recuperação para a indução da expressão de *HsGBA* em *C. reinhardtii*. Após experimento de *time-course*, a resolução dos produtos de RT-PCRs por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo permitiu sugerir que os maiores acúmulos de mRNA ocorrem com a exposição de células da linhagem G1 por 30 e 60 min a 40 °C, conforme intensidade das bandas de 150 pb correspondentes ao *amplicon* gerado com os *primers* HsGBA-For-qPCR e HsGBA-Rev-qPCR. As canaletas do gel estão identificadas pelo tempo, em minutos, em que as células permaneceram a 40 °C e pelo período de recuperação a 25 °C, quando aplicado, entre parênteses. Células de *C. reinhardtii* da linhagem D7 (transformada com pKS-*aphT*⁻-lox::*GFP*) foram utilizadas como controles negativos do experimento (imagem de gel à esquerda). O plasmídeo pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA* foi usado como controle positivo da reação (C+). O produto obtido pela amplificação do gene referência (*RBCS2*) com os *primers* CrRBCS2B-For e CrRBCS2B-Rev1 para cada condição testada é apresentado abaixo da imagem do gel. M: marcador de tamanhos de fragmentos de DNA, em pb, 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

4.7 Ensaio para a detecção da proteína recombinante HsGBA em *C. reinhardtii* por SDS-PAGE e *western blot*

Os parâmetros estabelecidos para a maior expressão do gene *HsGBA* em *C. reinhardtii*, isto é, choque térmico a 40 °C por 30 e 60 min, foram reproduzidos nos ensaios para análises de extratos proteicos e tentativas de detecção da proteína HsGBA recombinante. Após choque térmico, a extração de proteínas foi realizada por ultrassonicação de uma fração de células da linhagem G1 e da linhagem D7 (transformada com pKS-*aphT*-lox::*GFP* e usada como controle negativo do experimento) correspondentes aos tratamentos com choque térmico por 30 e por 60 min.

Apesar do procedimento de extração ter sido bem-sucedido, com a maior parte das proteínas concentradas na fração solúvel, quando alíquotas dos extratos proteicos foram resolvidas por SDS-PAGE, a banda esperada de aproximadamente 60 kDa, equivalente à HsGBA, só foi observada para o controle positivo imiglucerase (Cerezyme®, Genzyme), não sendo observadas diferenças entre o perfil de bandas da linhagem G1 e do controle negativo (linhagem D7) sob quaisquer dos tratamentos (Figura 19A). De forma semelhante, após transferência das amostras resolvidas em gel para membrana de nitrocelulose por *western blot*, hibridização e revelação com anticorpo monoclonal contra HsGBA por quimiluminescência, só foi observada marcação para o controle positivo imiglucerase (Figura 19B).

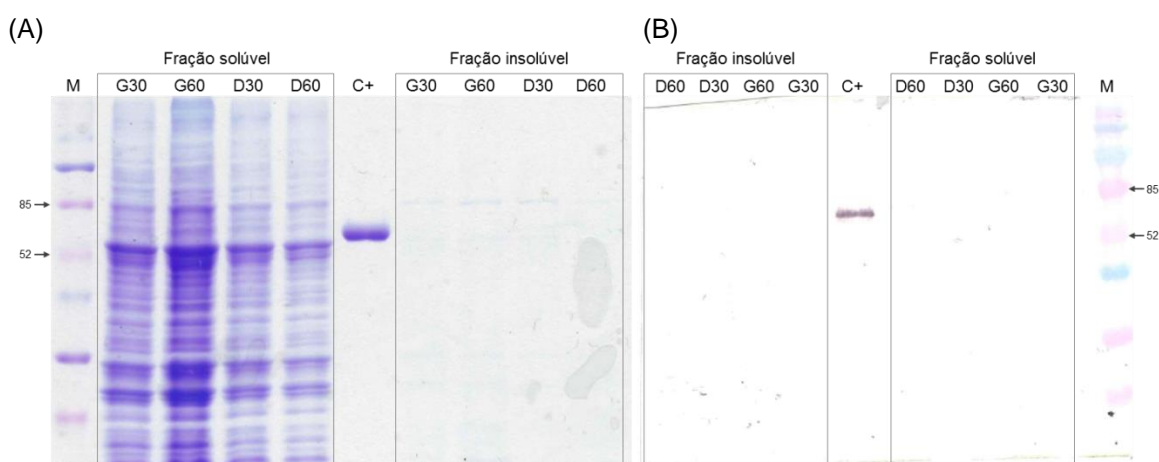


Figura 19: Ensaio de SDS-PAGE e *western blot* para detecção da proteína recombinante HsGBA em *C. reinhardtii*. Alíquotas de extratos proteicos obtidos por

ultrassonicação de células de *C. reinhardtii* submetidas a 40 °C por 30 e 60 min foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 %. (A) SDS-PAGE demonstrando que, apesar do êxito no processo de extração, com a maior parte das proteínas concentradas na fração solúvel (à esquerda), a banda de aproximadamente 60 kDa, equivalente à HsGBA (C+), não é detectada em quaisquer das frações para a linhagem G1, nem por 30 min a 40 °C (G30), nem por 60 min (G60). O perfil de bandas dessa linhagem não difere do observado para a linhagem D7 (transformada com pKS-*aph7*^{-lox::GFP}) submetida aos mesmos tratamentos (D30 e D60) como controle negativo do experimento. (B) Resultado de *western blot*, empregando anticorpo contra HsGBA, com marcação apenas para o controle positivo. M: marcador de peso molecular, em kDa, *ProSieve Color Protein Marker* (Lonza); C+: imiglucerase (Cerezyme[®], Genzyme).

Assim, embora a transcrição de *HsGBA* tenha sido comprovada para a linhagem G1, não foi possível a detecção da proteína recombinante a partir das culturas de *C. reinhardtii* transformadas sob as condições testadas.

4. 8 Avaliação da atividade enzimática de HsGBA em extratos proteicos

Ensaio bioquímicos foram realizados para avaliação da atividade enzimática da HsGBA no extrato proteico da linhagem de *C. reinhardtii* G1, obtido pela ultrassonicação de uma fração de células submetidas aos mesmos tratamentos descritos na seção 4.7 (choque térmico por 30 e por 60 min). Conforme ilustrado na Figura 20, a incubação do substrato 4-MUG com a fração solúvel dos extratos proteicos gerados a partir de células de *C. reinhardtii* submetidas a ambos os tratamentos de choque térmico (40 °C por 30 e 60 min) resultou em fluorescência semelhante à emitida pela incubação de 4-MUG com o controle negativo (fração solúvel do extrato da linhagem D7, transformada com pKS-*aph7*^{-lox::GFP}). As frações insolúveis dos extratos também foram testadas, mas a fluorescência emitida nos ensaios com a linhagem G1 foi inferior à emitida com o controle negativo (resultados não mostrados).

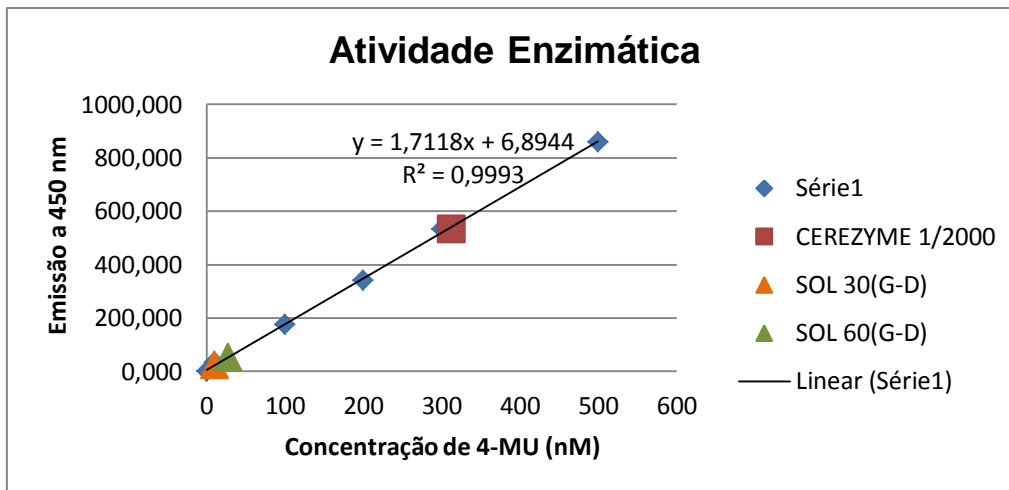


Figura 20: Avaliação da atividade da HsGBA nos extratos proteicos da linhagem de *C. reinhardtii* G1. No gráfico está representada a emissão de fluorescência resultante da hidrólise do substrato 4-MUG incubado com as frações solúveis dos extratos proteicos da linhagem G1 e da linhagem D7 (controle negativo) e com o controle positivo (Cerezyme[®], Genzyme). Após choque térmico por 30 ou 60 min necessário para a máxima expressão de *HsGBA*, a fluorescência emitida nos ensaios com a linhagem G1 foi semelhante à emitida com o controle negativo. Série1: curva padrão de 4-MU. Cerezyme[®] 1/2000: imiglucrase (Genzyme) diluída 2.000 vezes. SOL 30(G-D) e SOL 60(G-D): subtrações da fluorescência emitida no ensaio com a fração solúvel da linhagem G1 pela fluorescência emitida com o controle negativo após choque térmico por 30 e 60 min, respectivamente.

Sendo assim, os experimentos até aqui conduzidos não permitiram comprovar a presença de HsGBA ou a detecção de sua atividade enzimática em extratos proteicos da linhagem G1 de *C. reinhardtii*, mesmo sob indução da expressão do transgene com choques térmicos a 40 °C por 30 min ou por 60 min.

5. Discussão

Apesar dos avanços em busca de novas alternativas terapêuticas, a terapia de reposição enzimática da proteína glicocerebrosidase humana (HsGBA) permanece, desde seu início em 1991, como o tratamento padrão para a doença de Gaucher (Shemesh *et al.*, 2015). Atualmente, três formas recombinantes da enzima HsGBA estão disponíveis e, a despeito de sua eficácia e dos benefícios aos portadores da doença, seu custo permanece extremamente elevado, o que dificulta o acesso de muitos pacientes e agentes de saúde ao tratamento, especialmente em países com recursos mais limitados (Nagral, 2014; Essabar *et al.*, 2015). No Brasil, onde o tratamento é subsidiado pelo sistema público de saúde, o custo estimado para o tratamento de apenas 643 pacientes em 2013 totalizou mais de R\$ 114 milhões, conforme estimativas do Ministério da Saúde. Este representa um valor excessivamente superior ao custo do tratamento de muitas outras doenças prioritárias e de alta prevalência no país (Brasil, 2014b). Desta forma, o desenvolvimento de sistemas alternativos e mais econômicos para a produção da HsGBA poderia tornar mais acessível a terapia de reposição enzimática, além de reduzir a preocupação quanto à possibilidade de interrupção do fornecimento da enzima, como o ocorrido em 2009 em razão da contaminação viral de biorreatores da empresa produtora (Opar, 2011).

Enquanto Novo *et al.* (2012) propuseram um sistema diferente para a produção da HsGBA em células CHO e a um menor custo, e Sinclair *et al.* (2006) demonstraram a produção da enzima em células de insetos, outros grupos exploram a produção de HsGBA a partir de células vegetais. A HsGBA produzida em cultura de células de raiz de cenoura foi a primeira proteína humana produzida em plantas aprovada pela agência norte-americana FDA para fins terapêuticos, representando um marco para o desenvolvimento de outros biofármacos a partir de células vegetais (Opar, 2011; Mor, 2015). No entanto, 16 anos antes, Cramer *et al.* (1996) já haviam demonstrado a produção da proteína enzimaticamente ativa em extratos de folhas de tabaco, representando, também e àquela época, a primeira enzima lisossomal e uma das primeiras proteínas humanas produzida em plantas transgênicas. Além do acúmulo da enzima em folhas, demonstrada por esse grupo, e de sua produção em sementes de tabaco proposta por Reggi *et al.* (2005), uma estratégia de produção diferente foi desenvolvida por He *et al.* (2012) a partir de sementes de *A. thaliana cgl* (*complex-*

glycan-deficient), um mutante sem atividade da enzima *N*-acetilglicosamina-transferase I (GnT I). Como a GnT I é a primeira enzima na via de síntese de *N*-glicanos complexos, as glicoproteínas sintetizadas por esse mutante contêm alto teor de manose, o que é particularmente interessante no caso da HsGBA. Recentemente, Limkul *et al.* (2015) também demonstraram a produção da enzima em *N. benthamiana*. Entretanto, dentre todas essas estratégias, a mais inovadora, proposta por Shaaltiel *et al.* (2015), consiste na administração da HsGBA recombinante encapsulada em células de cenoura por via oral. Entre as inovações, a parede celular protegeria a proteína recombinante do suco gástrico e permitiria sua absorção no intestino.

Apesar de representar uma potencial plataforma para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacológico, não há, até o momento, relatos da obtenção da enzima HsGBA em células de microalgas, conforme ampla revisão bibliográfica realizada recentemente (seção 1.6). Sendo assim, propusemos por este trabalho a produção da HsGBA em células de *C. reinhardtii* tendo em vista as vantagens que esse micro-organismo oferece. Microalgas como *C. reinhardtii* oferecem um alto potencial para a síntese de grandes quantidades de proteínas recombinantes de forma rápida e a um custo muito inferior aos dos sistemas de produção tradicionais (Mayfield *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2011; Rasala e Mayfield, 2015).

Diversos trabalhos estabeleceram o cloroplasto de *C. reinhardtii* como um sistema adequado para a produção de diversas proteínas terapêuticas complexas e em níveis normalmente superiores aos obtidos a partir da transformação nuclear. Entretanto, apesar do correto enovelamento e da possibilidade de formação de pontes dissulfeto, outras modificações pós-traducionais como a glicosilação não ocorrem nas proteínas sintetizadas nessa organela (Rasala e Mayfield, 2015). Sendo assim, como a glicosilação é essencial para a atividade catalítica da HsGBA (Grabowski *et al.*, 1998), a transformação do genoma nuclear é a melhor alternativa para a produção da proteína recombinante em *C. reinhardtii*.

Além da maquinaria de transcrição, a expressão correta e estável de um gene em uma célula eucariótica depende de diversos fatores como proteínas regulatórias e enzimas modificadoras que interagem com elementos reguladores não codificadores, presentes em sequências específicas no genoma. Entre esses elementos destacam-se os promotores dos genes e suas diversas sequências regulatórias, elementos acentuadores

ou *enhancers*, que também estão presentes em íntrons, e elementos silenciadores que, sendo alvo para metilação, promovem a condensação da cromatina, inibindo a transcrição gênica. Muitos desses elementos são espécie-específicos, podendo variar, inclusive, entre diferentes tipos celulares em um mesmo organismo (Fuhrmann *et al.*, 1999). Em *C. reinhardtii*, vários desses elementos reguladores da expressão gênica têm sido identificados e diversas estratégias têm sido sugeridas para a expressão estável de transgenes para acúmulo de maiores níveis de proteínas recombinantes (Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2011; Mussnug, 2015; Rasala e Mayfield, 2015).

Seguindo as recomendações e princípios acima expostos, a primeira etapa deste trabalho foi a projeção da sequência do gene *HsGBA* a partir do cDNA humano com os códons otimizados para expressão nuclear em *C. reinhardtii* (Figura 6). Como em aproximadamente 85 % dos códons de *C. reinhardtii* o terceiro nucleotídeo é composto por guanina e citosina, diversos trabalhos têm demonstrado que a otimização de códons é uma etapa necessária para se aumentar o acúmulo de proteínas heterólogas nesse micro-organismo e, também, para reduzir a suscetibilidade do transgene ao silenciamento (Franklin e Mayfield, 2004; Potvin e Zhang, 2010; Gong *et al.*, 2011; Rosales-Mendoza *et al.*, 2012). Em outros trabalhos, o procedimento de adequação do uso preferencial de códons (do inglês, *codon usage*) permitiu aumentar em 5 vezes o acúmulo de GFP produzida a partir do genoma nuclear de *C. reinhardtii* e em até 80 vezes o acúmulo da proteína sintetizada a partir do genoma plastidial (Specht *et al.*, 2010). No entanto, embora a otimização de códons também seja recomendada para a expressão heteróloga em outros organismos (Puigbò *et al.*, 2007), essa estratégia parece inédita para a expressão de *HsGBA*. Nos trabalhos encontrados na literatura envolvendo outros sistemas de produção, a versão original do cDNA humano foi empregada para a obtenção da enzima (Cramer *et al.*, 1996; Hoppe, 2000; Reggi *et al.*, 2005; Sinclair *et al.*, 2006; Shaaltiel *et al.*, 2007; He *et al.*, 2012; Novo *et al.*, 2012).

O vetor pKS-*aphT*⁻-lox::*HsGBA* (Figura 10A), com cassetes em *tandem* para a expressão do gene de interesse *HsGBA* e do marcador de seleção *aphT*⁻ em *C. reinhardtii*, foi construído por recombinação sítio-específica mediada pelo sistema Cre/lox do bacteriófago P1, conforme proposto por Heitzer e Zschoernig (2007). Nesse sistema, por possuírem sequências de reconhecimento específicas (sítios *lox*), o plasmídeo contendo o gene de interesse (pHsp70A/RbcS2-*HsGBA*, Figura 7) foi fusionado ao vetor contendo o marcador de seleção (pKS-*aphT*⁻-lox, Figura 4) pela

ação da enzima Cre-recombinase, resultando no vetor de transformação de *C. reinhardtii* e expressão de *HsGBA* (pKS-*aph7*⁻-lox::*HsGBA*, Figura 10A).

No vetor pKS-*aph7*⁻-lox::*HsGBA*, o gene *aph7*⁻, que confere resistência à higromicina B às células transformadas, está sob o controle do forte promotor β 2-Tub e da 3'-UTR do gene da clamiopsina-1, e contém o primeiro íntron de *RBCS2* incorporado em sua sequência. Em contrapartida, o gene de interesse está sob o controle do promotor quimérico HSP70A/RBCS2 e da 3'-UTR do gene *RBCS2* de *C. reinhardtii*. Neste promotor, Schroda *et al.* (2000) demonstraram que HSP70A atua como um ativador transcricional de *RBCS2*, aumentando os níveis de expressão em condições basais ou induzíveis por luz e choque térmico (discutido mais adiante). Além disso, em experimentos independentes, o mesmo grupo demonstrou que HSP70A/RBCS2 aumentou significativamente a eficiência da transformação e reduziu a probabilidade de silenciamento do transgene por ele controlado (Schroda *et al.*, 2000; Schroda *et al.*, 2002). De maneira semelhante, Wu *et al.* (2008) observaram um aumento de oito vezes na eficiência de transformação com a utilização de HSP70A/RBCS2 em comparação ao emprego do promotor *RBCS2*. Além disso, a maior eficiência de expressão com o promotor quimérico, duas vezes superior à observada com o promotor *RBCS2*, foi aumentada ainda mais (cerca de três vezes) pela indução com choque térmico. Sendo assim, atualmente, a combinação do promotor quimérico HSP70A/RBCS2 com um ou mais íntrons do gene *RBCS2* é a mais recomendada para a obtenção de altos níveis de expressão transgênica a partir do genoma nuclear de *C. reinhardtii* (Mussnug, 2015).

Apesar de não codificarem uma sequência proteica na maioria dos casos, tem sido proposto que uma parte importante da informação genética essencial a uma célula eucariótica está contida dentro de íntrons. Além de participarem de processos como o embaralhamento de éxons e o processamento alternativo, esses elementos também regulam a transcrição, afetando a expressão de diversos genes. Assim como demonstrado em outros organismos, a inserção de íntrons na sequência de genes heterólogos também resulta no aumento da expressão transgênica em *C. reinhardtii* (Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009). Lumbreras *et al.* (1998), por exemplo, demonstraram que a inserção do primeiro íntron do gene *RBCS2* na sequência do marcador de seleção *ble* aumentou seus níveis de expressão, provavelmente em função de um elemento acentuador presente na sequência do íntron. De modo semelhante, Eichler-Stahlberg *et al.* (2009) observaram que a incorporação de um ou mais íntrons de *RBCS2* na

sequência do gene repórter codificador da enzima luciferase aumentou significativamente a atividade da enzima, e os maiores níveis foram determinados com a presença dos íntrons 1, 2 e 3 na sua ordem fisiológica. Essa disposição, associada ao promotor e a regiões não traduzidas de *RBCS2*, reproduz ao máximo a estrutura de um gene nativo de *C. reinhardtii*, favorecendo a expressão transgênica. No entanto, a despeito dessas evidências, somente o primeiro íntron de *RBCS2* foi empregado para a construção do vetor pKS-*aph7*^{-lox}::*HsGBA* no presente trabalho, sendo inserido entre o promotor quimérico e o gene de interesse. A inserção dos outros dois íntrons, a exemplo do trabalho de Eichler-Stahlberg *et al.* (2009), poderia possivelmente ter contribuído para o aumento da expressão de *HsGBA*.

O sucesso da transformação nuclear de *C. reinhardtii*, resultando em um grande número de colônias selecionadas com higromicina B (Figura 13), pode ser atribuído à eletroporação, técnica relativamente simples e com eficiência superior a dos métodos mais populares para transformação de microalgas como a agitação com partículas de vidro (Shimogawara *et al.*, 1998). Ao contrário desses outros métodos, a eletroporação normalmente propicia a integração de um menor número de cópias do transgene por transformante, o que contribui para reduzir efeitos de silenciamento, conforme discutido adiante (Potvin e Zhang, 2010). Embora não quantificada, é nítida a melhora promovida pela linearização do vetor pKS-*aph7*^{-lox}::*HsGBA* na eficiência da transformação nuclear de *C. reinhardtii* (Figura 13), conforme já descrito por outros autores (León-Bañares *et al.*, 2004). A prévia digestão do vetor com *EcoRV* resultou em um fragmento com cerca de 5 kb, contendo somente os cassetes para expressão do gene de interesse e do marcador de seleção. Essa estratégia minimiza a proporção de sequências heterólogas redundantes como as necessárias para a manutenção do plasmídeo em *E. coli*, suspeitas de estimular o silenciamento gênico em *C. reinhardtii* (Heitzer e Zschoernig, 2007).

As mesmas estratégias para a construção de pKS-*aph7*^{-lox}::*HsGBA*, discutidas até então, foram empregadas em paralelo para a geração do vetor pKS-*aph7*^{-lox}::*GFP* (Figura 10B), contendo *gfp* como gene repórter para validação de ensaios com *HsGBA*. No entanto, diante do insucesso nos experimentos para avaliação da integração (PCR) e expressão (microscopia de fluorescência) de *gfp*, em contraste com os resultados satisfatórios obtidos com o gene *HsGBA* de interesse, evidenciando sua integração e expressão, os experimentos com o gene repórter foram descontinuados,

prossequindo-se somente com análises de linhagens transformadas com *HsGBA*, conforme objetivo deste trabalho. Não dispomos de uma explicação razoável para a ausência de mRNA e atividade de GFP nas linhagens de *C. reinhardtii* recombinantes geradas pela transformação com pKS-*aph7*⁺-lox::GFP.

Com base em análises de sequências de sítios de inserção, Zhang *et al.* (2014) sugeriram que, durante a transformação por eletroporação, o DNA do vetor estaria sujeito à ação de endonucleases, as quais poderiam ocasionar a clivagem de algum dos cassetes de expressão antes da sua integração em *loci* aleatórios no genoma nuclear de *C. reinhardtii*. Isso explicaria porque somente 5 (14 %), entre 36 linhagens resistentes à higromicina B, demonstraram a integração de *HsGBA* (Figuras 14 e 15). Para as demais linhagens, poderia ter ocorrido a clivagem do cassete de expressão contendo *HsGBA* e, assim, somente o cassete com o marcador de seleção teria sido incorporado de forma íntegra no genoma. Embora a integração de *aph7*⁺ não tenha sido comprovada por métodos moleculares, a resistência à higromicina B apresentada pelas linhagens recuperadas na transformação permitiu inferir que, além de integrado, o gene está sendo expresso adequadamente.

Apesar da integração de *HsGBA* em 5 das 36 linhagens avaliadas, sua expressão somente pôde ser comprovada para F6, F9 e G1 (Figura 16), representando uma taxa de coexpressão (com *aph7*⁺) de 8 %. Esse valor, muito aquém do obtido por Heitzer e Zschoernig (2007) com construções semelhantes e mesmo promotor (58 %), assemelha-se aos índices máximos de coexpressão alcançados no passado (10 %), quando a transformação era realizada com dois plasmídeos independentes, um com o gene de interesse e o outro com o marcador de seleção (Heitzer e Zschoernig, 2007). Cabe ressaltar que tanto a taxa de cotransformação (14 %) como a de coexpressão (8 %) observadas neste trabalho podem estar subestimadas, pois as 36 linhagens avaliadas foram selecionadas aleatoriamente entre as diversas colônias resultantes da transformação de *C. reinhardtii* com o vetor pKS-*aph7*⁺-lox::*HsGBA* linearizado (Figura 13), representando, destarte, uma amostragem muito pequena. Sendo assim, os valores dessas taxas provavelmente seriam maiores se um maior número de colônias transformadas fosse avaliado.

Embora não quantificada, uma análise qualitativa demonstrou variação nos níveis de expressão de *HsGBA* entre as linhagens F6, F9 e G1 (Figura 16). É provável

que essa diferença entre linhagens transformadas com a mesma construção esteja relacionada a efeitos posicionais, resultantes da integração aleatória de *HsGBA* no genoma nuclear de *C. reinhardtii* conforme postulado por outros autores (Schroda *et al.*, 2002; Franklin e Mayfield, 2004). Berthold *et al.* (2002), por exemplo, atribuíram os altos níveis de resistência à higromicina B, observados para algumas linhagens transformadas com o marcador de seleção *aph7⁺*, à integração do gene em uma região de eucromatina ou nas proximidades de um forte promotor endógeno. Esses efeitos também poderiam justificar a ausência ou a fraca intensidade de bandas correspondentes à amplificação de *HsGBA* por RT-PCR, observadas na Figura 16 para as linhagens F5 e G5. No entanto, como não houve amplificação de fragmentos de cDNA relativos ao gene referência (*RBCS2*), pode-se supor que a má qualidade do RNA extraído para essas duas linhagens tenha impossibilitado a detecção da expressão de *HsGBA*. Por fim, a hipótese de silenciamento do transgene também deve ser considerada, tendo em vista que genes heterólogos são eficientemente reconhecidos e silenciados em *C. reinhardtii* (Schroda, 2006).

Mesmo com a inclusão de todos os elementos recomendados para a máxima expressão transgênica como promotores, íntrons e outras regiões regulatórias já discutidos anteriormente, os níveis de transcritos a partir do genoma nuclear de *C. reinhardtii* ainda podem ser muito baixos em decorrência de mecanismos de silenciamento. Embora esses mecanismos não sejam completamente compreendidos, parecem estar relacionados a uma variedade de efeitos epigenéticos, similares aos observados em plantas e outras células eucarióticas. Em nível transcricional, esses mecanismos bloqueariam o início da transcrição em consequência de alterações na estrutura da cromatina associadas à metilação de regiões promotoras, por exemplo. Já em nível pós-transcricional, o silenciamento envolveria a rápida degradação dos transcritos recém-sintetizados, podendo ser mediada, por exemplo, por RNA de interferência (León e Fernández, 2007; Gong *et al.*, 2011). Diante dessas limitações, Neupert *et al.* (2009) desenvolveram, por indução com luz ultravioleta, linhagens mutantes de *C. reinhardtii* com mecanismos de silenciamento deficientes e maior capacidade de expressão transgênica, possivelmente em função de alterações da estrutura da cromatina, embora o exato mecanismo não tenha sido elucidado. De maneira semelhante, Kong *et al.* (2015) identificaram, recentemente, uma linhagem de *C. reinhardtii* com mutações no gene *Dnmt1*, envolvido no silenciamento mediado por

metilação do DNA, e alta capacidade de expressão transgênica. Embora não descartado para as linhagens F5 e G5, o completo silenciamento de *HsGBA* parece não ocorrer nas outras três linhagens para as quais a ocorrência de transcrição foi comprovada. Apesar disto, a transformação de linhagens mutantes com alta capacidade de expressão transgênica com o vetor pKS-*aph7*^{-lox::HsGBA} poderia, no futuro, proporcionar níveis de transcritos ainda maiores. Por fim, o número de cópias de *HsGBA* integrado no genoma, não determinado neste trabalho, pode estar entre as causas da variação e/ou silenciamento da expressão observada entre as linhagens. Sabe-se que a integração de múltiplas cópias do transgene está associada a mecanismos de silenciamento dependentes de homologia, resultando em baixos níveis de expressão (Potvin e Zhang, 2010).

Em contraste com os resultados observados pelo grupo de Franklin e Mayfield (2004), em que os altos níveis de GFP obtidos após a transformação nuclear de *C. reinhardtii* foram rapidamente suprimidos, a expressão de *HsGBA* em nível de mRNA, pelo menos para a linhagem G1 avaliada até o final deste trabalho, demonstrou ser estável ao longo de várias gerações por, no mínimo, três anos, e sob contínua seleção com higromicina B. O sucesso aqui obtido pode ter sido consequência da utilização do promotor quimérico HSP70A/RBCS2. Nesse promotor, conforme sugerido por Schroda *et al.* (2002), a presença de elementos acentuadores na sequência de HSP70A potencializaria a transcrição de *HsGBA*, promovida por RBCS2. Outro mecanismo para a mais eficiente promoção da transcrição seria o recrutamento de complexos remodeladores da cromatina impulsionado por HSP70A, evitando, destarte, o silenciamento do transgene.

Para avaliar a expressão de *HsGBA* nas linhagens F5, F6, F9, G1 e G5, e para os ensaios iniciais de análises da proteína, células de *C. reinhardtii* foram incubadas por 1 h a 40 °C e, em seguida, por 2 h a 25 °C, condições estabelecidas por Schroda *et al.* (2000) para a máxima atividade da enzima arilsulfatase, codificada pelo gene *ARS* e sob o controle do promotor HSP70A, induzível por choque térmico. Tendo em vista os níveis de mRNA aparentemente baixos evidenciados por RT-PCR (Figura 16) e diante dos resultados negativos para a detecção da proteína (dados não mostrados), um experimento de *time-course* foi realizado visando otimizar a indução da expressão de *HsGBA*, determinando-se o acúmulo de mRNA em função do tempo após o choque térmico. Conforme análise qualitativa, os maiores níveis de transcritos foram obtidos

entre 30 e 60 min após a exposição a 40 °C (Figura 18), sem um período de recuperação das células a 25 °C, condições diferentes das empregadas até então. De modo semelhante, Schroda *et al.* (2000) já haviam descrito que, ao contrário do observado para a atividade enzimática da arilsulfatase, o maior acúmulo de transcritos ocorria nos primeiros 60 min a partir da indução por choque térmico. Após esse período, o subsequente desaparecimento do mRNA, com meia-vida estimada em torno de 15 min, foi atribuído pelos autores ao desligamento do promotor HSP70A depois de 60 min e à intrínseca instabilidade dos transcritos. Em contrapartida, com um atraso de aproximadamente 30 min em relação aos níveis de mRNA, um aumento de 26 vezes na atividade da enzima ARS foi determinado pelo grupo 90 min após a indução, mantendo-se estável por mais 90 min.

Entretanto, mesmo com o emprego das novas condições, ideais para máxima expressão de *HsGBA*, não foi possível detectar a proteína por SDS-PAGE e *western blot* (Figura 19). De modo semelhante, Rasala *et al.* (2010) observaram uma fraca correlação entre os níveis de transcritos e o acúmulo de proteínas recombinantes. Como esse acúmulo parece não ser determinado pela transcrição e pelos níveis de mRNA, os autores atribuíram os baixos rendimentos à possível instabilidade da proteína sintetizada ou a problemas na tradução do mRNA quimérico.

Adicionalmente, também é possível que a proteína recombinante esteja sendo alvo de mecanismos pós-traducionais, resultando em um acúmulo abaixo dos limites de detecção. A regulação da síntese de proteínas recombinantes é, de fato, um sistema complexo que envolve a interação entre diferentes elementos. Além de todos os fatores que influenciam a transcrição gênica, conforme já discutido, o acúmulo de proteínas recombinantes também é regulado por outros mecanismos celulares, resultando de um balanço entre as taxas de síntese e degradação. Em *C. reinhardtii*, a degradação proteolítica é considerada um dos principais fatores que afetam o rendimento de proteínas recombinantes (Surzycki *et al.*, 2009). Embora essenciais para o processamento de proteínas endógenas, as enzimas proteolíticas podem degradar também as proteínas heterólogas após sua elongação, interferir em sua correta montagem e na realização de modificações pós-traducionais. Como consequência, além de reduzir o rendimento, essa degradação pode levar a resultados inconsistentes e dificultar a purificação devido à degradação ou à presença de fragmentos de proteína não-funcional (Potvin e Zhang, 2010; Gong *et al.*, 2011; Rosales-Mendoza *et al.*, 2012).

Considerando a degradação proteolítica o principal problema para a produção de HsGBA em folhas de tabaco, Reggi *et al.* (2005) direcionaram a síntese da enzima às sementes da planta, uma vez que esse órgão é isento de proteases e rico em seus inibidores. De modo semelhante, o endereçamento da HsGBA para armazenamento nos vacúolos, tendo em vista os baixos níveis de proteases presentes na organela, foi a estratégia adotada por Shaaltiel *et al.* (2007) na produção da enzima em células de raiz de cenoura. Diversas outras estratégias idealizadas para plantas têm sido propostas para minimizar a degradação resultante da ação de enzimas proteolíticas em microalgas. Destacam-se, entre elas, o desenvolvimento de linhagens mutantes de *C. reinhardtii* deficientes em proteases, a identificação e a modificação dos alvos de ação dessas enzimas na sequência da proteína heteróloga, a coexpressão de inibidores de protease e o endereçamento da proteína recombinante a organelas como o retículo endoplasmático, onde a falta de proteases e a abundância de chaperonas contribuem para o enovelamento adequado e para a estabilidade de certas proteínas, ou ao cloroplasto, para armazenamento em um ambiente mais protegido, com menor atividade proteolítica (Potvin e Zhang, 2010; Gong *et al.*, 2011; Rosales-Mendoza *et al.*, 2012).

Embora a ocorrência de degradação proteolítica seja uma hipótese plausível, algumas limitações deste trabalho devem ser consideradas pois podem ter influenciado, de alguma forma, os resultados obtidos, impossibilitando a detecção da proteína recombinante. A correta transcrição de *HsGBA*, por exemplo, foi confirmada somente para uma pequena parte do gene (aproximadamente 10 %), conforme determinado pelo sequenciamento dos produtos das RT-PCRs e alinhamento com a sequência de bases projetada para *HsGBA* (Figura 17A). No entanto, considerando que diferenças de bases em outras regiões do gene podem estar levando à síntese de uma proteína inativa e indetectável, o completo sequenciamento é fundamental antes da execução de futuras etapas deste trabalho.

Outra possível causa de insucesso pode estar relacionada às condições de indução da expressão do gene *HsGBA* controlado pelo promotor HSP70A/RBCS2. Schroda *et al.* (2000), avaliando diversas combinações de sequências promotoras, detectaram os maiores níveis de transcritos com o emprego de HSP70A/RBCS2 sob choque térmico. Um menor acúmulo de mRNA, embora superior ao observado nas condições basais, foi proporcionado pela exposição das células à luz durante uma hora após período de incubação no escuro, demonstrando que o promotor HSP70A/RBCS2

também pode ser induzido, em menor grau, pela luz. Analisando os transcritos obtidos nas diferentes circunstâncias, os autores constataram que, em condições basais e de indução por luz, a transcrição iniciava no promotor proximal RBCS2, enquanto o choque térmico promovia a transcrição a partir do promotor mais distal, HSP70A. De acordo com essa teoria, na expressão de *HsGBA* sob choque térmico, a sequência do promotor RBCS2 também poderia ser transcrita, a montante do gene de interesse, e códons de iniciação presentes nessa sequência poderiam alterar o quadro de leitura, levando à tradução de uma proteína inativa (Schroda *et al.*, 2002). Por outro lado, a ativação de HSP70A por luz promoveria a transcrição de *HsGBA* a partir do promotor RBCS2 e, conseqüentemente, a tradução teria início no códon correto, conforme a sequência projetada. Entretanto, essas condições de indução por luz não foram testadas no presente trabalho e, a despeito de um menor rendimento, poderiam ter propiciado a detecção da proteína HsGBA. Por fim, contrariando a hipótese de que o choque térmico resultaria em uma proteína inativa, Wu *et al.* (2008) investigaram a função do promotor HSP70A/RBCS2 por meio da avaliação de fluorescência de GFP, em oposição aos resultados obtidos pelo grupo de Schroda *et al.* (2000), baseados em análises de mRNA. Nesses novos ensaios, a indução por choque térmico a 40 °C por 20 min não só resultou na correta tradução da proteína mas, também, em níveis de fluorescência 3 vezes maiores que os observados nas condições basais, demonstrando que a aplicação de choque térmico é uma estratégia viável para a obtenção de um maior acúmulo de proteínas a partir de genes controlados pelo promotor HSP70A/RBCS2.

A detecção de HsGBA em extratos proteicos de *C. reinhardtii* também não foi possível por meio de ensaios bioquímicos. Após aplicação de choque térmico, a fluorescência resultante da hidrólise do substrato 4-MUG emitida nos ensaios com a linhagem G1 foi semelhante à emitida com o controle negativo, sugerindo a inexistência de atividade enzimática para a linhagem testada (Figura 20). Embora as possíveis razões já tenham sido discutidas para justificar a ausência da proteína, cabe mencionar que o método empregado para avaliar a atividade enzimática pode não ser apropriado ao tipo de amostra, levando a resultados falso-negativos. O mesmo teste fluorimétrico empregado neste trabalho foi considerado inadequado por Reggi *et al.* (2005) para a determinação da atividade da enzima em extratos brutos de folhas e sementes de tabaco transformado com *HsGBA*, em razão da elevada atividade intrínseca observada para as amostras, inclusive para os controles negativos. A ocorrência de atividade intrínseca

também foi diagnosticada por He *et al.* (2012) em extratos proteicos de sementes não transformadas de *A. thaliana*, sendo atribuída, pelos autores, a enzimas endógenas capazes de hidrolisar o substrato 4-MUG. O problema foi solucionado por Reggi *et al.* (2005) por meio de imunocromatografia, o que permitiu o isolamento de HsGBA da maior parte das proteínas solúveis presentes no extrato.

Conforme mencionado, Reggi *et al.* (2005) conseguiram isolar HsGBA da maior parte das proteínas solúveis presentes no extrato por meio de imunocromatografia, o que tornou factível a determinação da atividade enzimática. Outra estratégia interessante para o isolamento de proteínas recombinantes, e que também poderia ter contribuído para o sucesso do presente trabalho, foi a adição, por Eichler-Stahlberg *et al.* (2009), de uma cauda de histidinas na extremidade carbóxi-terminal da sequência polipeptídica da eritropoietina. Além dessa adição, o peptídeo-sinal da proteína humana foi substituído pelo da enzima arilsulfatase de *C. reinhardtii* visando a secreção da eritropoietina para o meio de cultura e possibilitando o seu isolamento por cromatografia de afinidade por íons metálicos de forma rápida e simples. Sendo assim, apesar do procedimento de extração bem sucedido (Figura 19A), a adição de uma cauda de histidinas e a substituição dos primeiros 39 aminoácidos da HsGBA (Figura 6) pelo sinal de secreção da enzima arilsulfatase poderiam ter facilitado os processos de produção e purificação da enzima, contribuindo para o sucesso deste trabalho. A secreção da proteína recombinante para o meio de cultura não só facilitaria seu isolamento, mas também preveniria sua degradação por proteases presentes no citosol (Wijffels *et al.*, 2013). Assim como Eichler-Stahlberg *et al.* (2009), outros pesquisadores também substituíram o peptídeo-sinal humano pelo de uma proteína do próprio hospedeiro para a produção da HsGBA em diferentes sistemas. Na produção em sementes de *A. thaliana*, por exemplo, He *et al.* (2012) substituíram o peptídeo-sinal da enzima humana pelo da arcelina de feijão (ARC5-I), enquanto na produção em sementes de tabaco pelo grupo de Reggi *et al.* (2005), a substituição foi pelo peptídeo-sinal da globulina 7S de soja, o qual direciona a proteína ao retículo endoplasmático. Também visando o endereçamento a essa organela, Shaaltiel *et al.* (2007) substituíram o peptídeo-sinal nativo pelo da endoquitinase básica de *A. thaliana*, conforme já descrito na seção 1.3. Por fim, na tentativa de produzir a enzima em células *Sf 9* do inseto *Spodoptera frugiperda*, Sinclair *et al.* (2006) mantiveram, em oposição aos outros pesquisadores, o peptídeo original de 39 aminoácidos da HsGBA, o mesmo utilizado

nas construções do presente trabalho (Figura 6). Embora fosse esperado que a proteína recombinante se concentrasse nos lisossomos das células *Sf 9*, conforme ocorre em células humanas, a maior atividade enzimática foi determinada pelos autores no meio de cultura, levando-os à conclusão de que, pelo menos em células animais, a secreção da HsGBA depende do tipo celular em que é produzida. Portanto, de acordo com os resultados de Sinclair *et al.* (2006), a hipótese de que a HsGBA esteja sendo secretada pelas células transformadas de *C. reinhardtii* não pode ser completamente descartada e, diante disto, a avaliação da proteína no meio de cultura poderia ser considerada nas futuras etapas deste trabalho.

O reconhecimento da alglucerase como o fármaco mais transformador dos últimos 20 anos no campo da genética médica realça o grande impacto que o desenvolvimento de outras formas da HsGBA vem exercendo na vida dos pacientes com a doença de Gaucher (Kesselheim e Avorn, 2013) e dos agentes de saúde, particularmente de sistemas públicos. Além de todos os benefícios proporcionados aos portadores da doença pelas três formas recombinantes da enzima atualmente disponíveis, existe ainda a expectativa de que, no futuro, a HsGBA possa contribuir também no tratamento dos pacientes com a doença de Parkinson (Elstein *et al.*, 2015). Visando o desenvolvimento de mais uma opção terapêutica, por este trabalho tivemos como objetivo a produção da HsGBA a partir do genoma nuclear de *C. reinhardtii*. Embora a proteína não tenha sido detectada, grande parte dos objetivos específicos foram concretizados, demonstrando-se, inclusive, a expressão transgênica em nível de mRNA nas linhagens transformadas. A modificação genética de *C. reinhardtii* representa um pioneirismo em nosso grupo de pesquisa e, sendo assim, tanto o estabelecimento e manutenção das culturas, na fase inicial, como a aplicação de todos os métodos para a análise dos transformantes podem ser considerados um importante legado deste trabalho, servindo como base para o desenvolvimento de outras proteínas terapêuticas, atualmente o campo de mais rápido crescimento da indústria farmacêutica (Grabowski *et al.*, 2014).

Apesar dos relatos bem-sucedidos da produção de proteínas recombinantes em cloroplastos de *C. reinhardtii*, correspondendo a até 20 % do total de proteínas solúveis, em diversos trabalhos, especialmente baseados na transformação nuclear, níveis baixos a indetectáveis de proteína são documentados (Almaraz-Delgado *et al.*, 2014). De fato, além do baixo rendimento, a variedade de proteínas recombinantes produzidas a partir

do genoma nuclear (Tabela 4) é muito inferior à obtida com a transformação plastidial (Tabela 3) e as razões para a menor expressão de genes heterólogos a partir do núcleo ainda não são completamente compreendidas (Mussnug, 2015).

Embora diversos elementos identificados como essenciais para o sucesso da expressão transgênica tenham sido empregados na construção dos plasmídeos utilizados neste trabalho, o desenvolvimento de novos vetores com a adição de mais de um íntron e de uma cauda de histidinas à sequência de *HsGBA*, bem como a substituição do peptídeo-sinal original por um que promova a secreção da enzima, poderia resultar em maiores níveis de expressão e no isolamento da proteína recombinante. Alternativamente, o direcionamento da proteína para armazenamento no cloroplasto ou a transformação de linhagens mutantes de *C. reinhardtii* deficientes em proteases poderiam contribuir, de modo semelhante, para um maior acúmulo da HsGBA. Além disso, conforme já discutido, investigar a influência da luz na expressão de *HsGBA* também seria interessante nas futuras etapas deste trabalho. Por fim, considerando-se a importância da glicosilação para que a enzima administrada possa ser eficientemente captada pelos macrófagos e direcionadas a seus lisossomos, cabe salientar que a análise do perfil de glicanos da HsGBA produzida em *C. reinhardtii* será fundamental após o seu isolamento.

6. Referências Bibliográficas

ALCALAY, R. N.; LEVY, O. A.; WATERS, C. C.; FAHN, S.; FORD, B.; KUO, S. H.; MAZZONI, P.; PAUCIULO, M. W.; NICHOLS, W. C.; GAN-OR, Z.; ROULEAU, G. A.; CHUNG, W. K.; WOLF, P.; OLIVA, P.; KEUTZER, J.; MARDER, K. & ZHANG, X. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain*, 138: 2648–2658, 2015.

ALMARAZ-DELGADO, A. L.; FLORES-URIBE, J.; PÉREZ-ESPAÑA, V. H.; SALGADO-MANJARREZ, E. & BADILLO-CORONA, J. A. Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *AMB Express*, 4: 57, 2014.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A. & STRUHL, K. *Short Protocols in Molecular Biology*. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 2002.

BARIS, H. N.; COHEN, I. J. & MISTRY, P. K. Gaucher disease: the metabolic defect, pathophysiology, phenotypes and natural history. *Pediatric endocrinology reviews*, 12 (1): 72-81, 2014.

BARRERA, D. J.; ROSENBERG, J. N.; CHIU, J. G.; CHANG, Y. N.; DEBATIS, M.; NGOI, S. M.; CHANG, J. T.; SHOEMAKER, C. B.; OYLER, G. A. & MAYFIELD, S. P. Algal chloroplast produced camelid VHH antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin. *Plant Biotechnology Journal*, 13 (1): 117-124, 2015.

BERTALAN, I.; MUNDER, M. C.; WEIß, C.; KOPF, J.; FISCHER, D. & JOHANNINGMEIER, U. A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, 195: 60-66, 2015.

BERTHOLD, P.; SCHMITT, R. & MAGES, W. An engineered *Streptomyces hygrosopicus aph 7"* gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist*, 153 (4): 401-412, 2002.

BEUTLER, E. Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science*, 256 (5058): 794-799, 1992.

BLABY, I. K.; BLABY-HAAS, C.; TOURASSE, N.; HOM, E. F. Y.; LOPEZ, D.; AKSOY, M.; GROSSMAN, A.; UMEN, J.; DUTCHER, S.; PORTER, M.; KING, S.; WITMAN, G.; STANKE, M.; HARRIS, E. H.; GOODSTEIN, D.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, J.; VALLON, O.; MERCHANT, S. S. & PROCHNIK, S. The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends in Plant Science*, 19 (10): 672-680, 2014.

BLANZ, J.; ZUNKE, F.; MARKMANN, S.; DAMME, M.; BRAULKE, T.; SAFTIG, P. & SCHWAKE, M. Mannose 6-phosphate-independent lysosomal sorting of LIMP-2. *Traffic*, 16 (10): 1127-36, 2015.

BRADY, R. O. Gaucher's disease: past, present and future. *Baillieres Clinical Haematology*, 10 (4): 621-634, 1997.

BRASIL. *Portaria SAS/MS n. 449, de 08 de julho de 2002*: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, 2002.

_____. *Ofício Circular n.º 58/DAF/SCTIE/MS, de 25 de agosto de 2010 - Fornecimento de taliglucerase alfa 200U*: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica, 2010.

_____. *Portaria SAS/MS n. 708, de 25 de outubro de 2011*: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, 2011.

_____. *Portaria n. 37, de 26 de setembro de 2014*: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, 2014a.

_____. *Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC – 124 - Alfataliglicerase para o tratamento da Doença de Gaucher*: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde, 2014b.

BROCKMANN, K. & BERG, D. The significance of GBA for Parkinson's disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37 (4): 643-648, 2014.

CORCHERO, J. L.; GASSER, B.; RESINA, D.; SMITH, W.; PARRILLI, E.; VÁZQUEZ, F.; ABASOLO, I.; GIULIANI, M.; JÄNTTI, J.; FERRER, P.; SALOHEIMO, M.; MATTANOVICH, D.; SCHWARTZ, S. Jr.; TUTINO, M. L. & VILLAVARDE, A. Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics. *Biotechnology Advances*, 31 (2): 140-153, 2013.

CRAMER, C. L.; WEISSENORN, D. L.; OISHI, K. K.; GRABAU, E. A.; BENNETT, S.; PONCE, E.; GRABOWSKI, G. A. & RADIN, D. N. Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 792: 62-71, 1996.

DAUVILLÉE, D.; DELHAYE, S.; GRUYER, S.; SLOMIANNY, C.; MORETZ, S. E.; D'HULST, C.; LONG, C. A.; BALL, S. G. & TOMAVO, S. Engineering the chloroplast targeted malarial vaccine antigens in *Chlamydomonas* starch granules. *PLoS One*, 5 (12): e15424, 2010.

DEMURTAS, O. C.; MASSA, S.; FERRANTE, P.; VENUTI, A.; FRANCONI, R. & GIULIANO, G. A *Chlamydomonas*-derived Human Papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. *PLoS One*, 8 (4): e61473, 2013.

DOYLE, J. & DOYLE, J. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15, 1987.

DREESEN, I. A. J.; CHARPIN-EL HAMRI, G. & FUSSENEGGER, M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Biotechnology*, 145 (3): 273-280, 2010.

EICHLER-STAHLEBERG, A.; WEISHEIT, W.; RUECKER, O. & HEITZER, M. Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 229 (4): 873-883, 2009.

ELSTEIN, D.; ALCALAY, R. & ZIMRAN, A. The emergence of Parkinson disease among patients with Gaucher disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29 (2): 249-259, 2015.

ESSABAR, L.; MESKINI, T.; LAMALMI, N.; ETTAIR, S.; ERREIMI, N. & MOUANE, N. Gaucher's disease: report of 11 cases with review of literature. *The Pan African medical journal*, 20: 18, 2015.

FLETCHER, S. P.; MUTO, M. & MAYFIELD, S. P. Optimization of recombinant protein expression in the chloroplasts of green algae. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 616: 90-98, 2007.

FRANKLIN, S. E. & MAYFIELD, S. P. Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (2): 159-165, 2004.

FUHRMANN, M.; HAUSHERR, A.; FERBITZ, L.; SCHÖDL, T.; HEITZER, M. & HEGEMANN, P. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant molecular biology*, 55 (6): 869-881, 2004.

FUHRMANN, M.; OERTEL, W. & HEGEMANN, P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, 19 (3): 353-361, 1999.

GANGL, D.; ZEDLER, J. A.; RAJAKUMAR, P. D.; MARTINEZ, E. M.; RISELEY, A.; WŁODARCZYK, A.; PURTON, S.; SAKURAGI, Y.; HOWE, C. J.; JENSEN, P. E. & ROBINSON, C. Biotechnological exploitation of microalgae. *Journal of Experimental Botany*, 66 (22): 6975-6990, 2015.

GONG, Y.; HU, H.; GAO, Y.; XU, X. & GAO, H. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38 (12): 1879-1890, 2011.

GORMAN, D. S. & LEVINE, R. P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 54 (6): 1665-1669, 1965.

GRABOWSKI, G. A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet*, 372 (9645): 1263-1271, 2008.

GRABOWSKI, G. A. Gaucher disease and other storage disorders. *Hematology – American Society Hematology – Education Program*, 2012: 13-18, 2012.

GRABOWSKI, G. A.; GOLEMBO, M. & SHAALTIEL, Y. Taliglucerase alfa: An enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Molecular Genetics and Metabolism*, 112 (1): 1-8, 2014.

GRABOWSKI, G. A.; LESLIE, N. & WENSTRUP, R. Enzyme therapy for Gaucher disease: the first 5 years. *Blood Reviews*, 12 (2): 115-133, 1998.

GREGORY, J. A.; LI, F.; TOMOSADA, L. M.; COX, C. J.; TOPOL, A. B.; VINETZ, J. M. & MAYFIELD, S. Algae-produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. *PLoS One*, 7 (5): e37179, 2012.

GREGORY, J. A.; TOPOL, A. B.; DOERNER, D. Z. & MAYFIELD, S. Alga-Produced Cholera Toxin-Pfs25 Fusion Proteins as Oral Vaccines. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (13): 3917-3925, 2013.

GRIESBECK, C.; KOBL, I. & HEITZER, M. *Chlamydomonas reinhardtii*: a protein expression system for pharmaceutical and biotechnological proteins. *Molecular Biotechnology*, 34 (2): 213-223, 2006.

HARMANCI, O. & BAYRAKTAR, Y. Gaucher disease: new developments in treatment and etiology. *World Journal of Gastroenterology*, 14 (25): 3968-3973, 2008.

HE, D. M.; QIAN, K. X.; SHEN, G. F.; ZHANG, Z. F.; LI, Y. N.; SU, Z. L. & SHAO, H. B. Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 55 (1): 26-30, 2007.

HE, X.; GALPIN, J. D.; TROPAK, M. B.; MAHURAN, D.; HASELHORST, T.; VON ITZSTEIN, M.; KOLARICH, D.; PACKER, N. H.; MIAO, Y.; JIANG, L.; GRABOWSKI, G. A.; CLARKE, L. A. & KERMODE, A. R. Production of active human glucocerebrosidase in seeds of *Arabidopsis thaliana* complex-glycan-deficient (cgl) plants. *Glycobiology*, 22 (4): 492-503, 2012.

HEITZER, M. & ZSCHOERNIG, B. Construction of modular tandem expression vectors for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* using the Cre/lox-system. *Biotechniques*, 43 (3): 324-332, 2007.

HOLLERAN, W. M.; TAKAGI, Y.; IMOKAWA, G.; JACKSON, S.; LEE, J. M. & ELIAS, P. M. Beta-Glucocerebrosidase activity in murine epidermis: characterization and localization in relation to differentiation. *Journal of Lipid Research*, 33 (8): 1201-1209, 1992.

HOPPE, H. Cerezyme – recombinant protein treatment for Gaucher's disease. *Journal of Biotechnology*, 76 (2-3): 259-261, 2000.

HOROWITZ, M.; WILDER, S.; HOROWITZ, Z.; REINER, O.; GELBART, T. & BEUTLER, E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics*, 4 (1): 87-96, 1989.

HOU, Q.; QIU, S.; LIU, Q.; TIAN, J.; HU, Z. & NI, J. Selenoprotein-Transgenic *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nutrients*, 5 (3): 624-636, 2013.

HUANG, W. J.; ZHANG, X. & CHEN, W. W. Gaucher disease: a lysosomal neurodegenerative disorder. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19 (7): 1219-1226, 2015.

INOUE, H.; NOJIMA, H. & OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96 (1): 23-28, 1990.

JONES, C. S.; LUONG, T.; HANNON, M.; TRAN, M.; GREGORY, J. A.; SHEN, Z.; BRIGGS, S. P. & MAYFIELD, S. P. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (5): 1987-1995, 2013.

KESSELHEIM, A. S. & AVORN, J. The most transformative drugs of the past 25 years: a survey of physicians. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12 (6): 425-431, 2013.

KONG, F.; YAMASAKI, T.; KURNIASIH, S. D.; HOU, L.; LI, X.; IVANOVA, N.; OKADA, S. & OHAMA, T. Robust expression of heterologous genes by selection marker fusion system in improved *Chlamydomonas* strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120 (3): 239-245, 2015.

KORBIE, D. J. & MATTICK, J. S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3 (9): 1452-1456, 2008.

LAUERSEN, K. J.; BERGER, H.; MUSSGNUM, J. H. & KRUSE, O. Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, 167 (2): 101-110, 2013.

LEÓN, R. & FERNÁNDEZ, E. Nuclear transformation of eukaryotic microalgae: historical overview, achievements and problems. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 616: 1-11, 2007.

LEÓN-BAÑARES, R.; GONZÁLEZ-BALLESTER, D.; GALVÁN, A. & FERNÁNDEZ, E. Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends in Biotechnology*, 22 (1): 45-52, 2004.

LIMKUL, J.; MISAKI, R.; KATO, K. & FUJIYAMA, K. The combination of plant translational enhancers and terminator increase the expression of human glucocerebrosidase in *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant Science*, 240: 41-49, 2015.

LIU, B.; HAFHEY, W. D.; GREIS, K. D. & GRABOWSKI, G. A. The LIMP-2/SCARB2 binding motif on acid β -glucosidase: basic and applied implications for Gaucher disease and associated neurodegenerative diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (43): 30063-30074, 2014.

LUMBRERAS, V.; STEVENS, D. R. & PURTON, S. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *The Plant Journal*, 14 (4): 441-447, 1998.

MANKIN, H. J. Gaucher's disease: a novel treatment and an important breakthrough. *The Journal of Bone and Joint Surgery (British volume)*, 75 (1): 2-3, 1993.

MANUELL, A. L.; BELIGNI, M. V.; ELDER, J. H.; SIEFKER, D. T.; TRAN, M.; WEBER, A.; MCDONALD, T. L. & MAYFIELD, S. P. Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnology Journal*, 5 (3): 402-412, 2007.

MARTINS, A. M.; VALADARES, E. R.; PORTA, G.; COELHO, J.; SEMIONATO FILHO, J.; PIANOVSKI, M. A.; KERSTENETZKY, M. S.; MONTORIL, M. F.; ARANDA, P. C.; PIRES, R. F.; MOTA, R. M. & BORTOLHEIRO, T. C. Recommendations on Diagnosis, Treatment, and Monitoring for Gaucher Disease. *Journal of Pediatrics*, 155 (4): S10-S18, 2009.

MAXMEN, A. Drug-making plant blooms. *Nature*, 485 (7397): 160, 2012.

MAYFIELD, S. P.; FRANKLIN, S. E. & LERNER, R. A. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (2): 438-442, 2003.

MAYFIELD, S. P.; MANUELL, A. L.; CHEN, S.; WU, J.; TRAN, M.; SIEFKER, D.; MUTO, M. & MARIN-NAVARRO, J. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (2): 126-133, 2007.

MERCHANT, S. S.; PROCHNIK, S. E.; VALLON, O.; HARRIS, E. H.; KARPOWICZ, S. J.; WITMAN, G. B.; TERRY, A.; SALAMOV, A.; FRITZ-LAYLIN, L. K.; MARÉCHAL-DROUARD, L.; MARSHALL, W. F.; QU, L. H.; NELSON, D. R.; SANDERFOOT, A. A.; SPALDING, M. H.; KAPITONOV, V. V.; REN, Q.; FERRIS, P.; LINDQUIST, E.; SHAPIRO, H.; LUCAS, S. M.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, J.; CARDOL, P.; CERUTTI, H.; CHANFREAU, G.; CHEN, C. L.;

COGNAT, V.; CROFT, M. T.; DENT, R.; DUTCHER, S.; FERNÁNDEZ, E.; FUKUZAWA, H.; GONZÁLEZ-BALLESTER, D.; GONZÁLEZ-HALPHEN, D.; HALLMANN, A.; HANIKENNE, M.; HIPPLER, M.; INWOOD, W.; JABBARI, K.; KALANON, M.; KURAS, R.; LEFEBVRE, P. A.; LEMAIRE, S. D.; LOBANOV, A. V.; LOHR, M.; MANUELL, A.; MEIER, I.; METS, L.; MITTAG, M.; MITTELMEIER, T.; MORONEY, J. V.; MOSELEY, J.; NAPOLI, C.; NEDELCO, A. M.; NIYOGI, K.; NOVOSELOV, S. V.; PAULSEN, I. T.; PAZOUR, G.; PURTON, S.; RAL, J. P.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; RIEKHOF, W.; RYMARQUIS, L.; SCHRODA, M.; STERN, D.; UMEN, J.; WILLOWS, R.; WILSON, N.; ZIMMER, S. L.; ALLMER, J.; BALK, J.; BISOVA, K.; CHEN, C. J.; ELIAS, M.; GENDLER, K.; HAUSER, C.; LAMB, M. R.; LEDFORD, H.; LONG, J. C.; MINAGAWA, J.; PAGE, M. D.; PAN, J.; POOTAKHAM, W.; ROJE, S.; ROSE, A.; STAHLBERG, E.; TERAUCHI, A. M.; YANG, P.; BALL, S.; BOWLER, C.; DIECKMANN, C. L.; GLADYSHEV, V. N.; GREEN, P.; JORGENSEN, R.; MAYFIELD, S.; MUELLER-ROEBER, B.; RAJAMANI, S.; SAYRE, R. T.; BROKSTEIN, P.; DUBCHAK, I.; GOODSTEIN, D.; HORNICK, L.; HUANG, Y. W.; JHAVERI, J.; LUO, Y.; MARTÍNEZ, D.; NGAU, W. C.; OTILLAR, B.; POLIAKOV, A.; PORTER, A.; SZAJKOWSKI, L.; WERNER, G.; ZHOU, K.; GRIGORIEV, I. V.; ROKHSAR, D. S. & GROSSMAN, A. R. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318 (5848): 245-251, 2007.

MISTRY, P. K.; BELMATOUG, N.; VOM, DAHL, S. & GIUGLIANI, R.. Understanding the natural history of Gaucher disease. *American Journal of Hematology*, 90 (Suppl 1): S6-S11, 2015.

MOR, T. S. Molecular pharming's foot in the FDA's door: Protalix's trailblazing story. *Biotechnology Letters*, 37 (11): 2147-2150, 2015.

MOTTA, I.; FILOCAMO, M.; POGGIALI, E.; STROPPIANO, M.; DRAGANI, A.; CONSONNI, D.; BARCELLINI, W.; GAIDANO, G.; FACCHINI, L.; SPECCHIA, G. & CAPPELLINI, M. D. A multicentre observational study for early diagnosis of Gaucher disease in patients with Splenomegaly and/or Thrombocytopenia. *European Journal of Haematology*, 96 (4): 352-359, 2016.

MUCCI, J. M. & ROZENFELD, P. Pathogenesis of Bone Alterations in Gaucher Disease: The Role of Immune System. *Journal of Immunology Research*, 2015:192761, 2015.

MULLIN, S. & SCHAPIRA, A. The genetics of Parkinson's disease. *British Medical Bulletin*, 114 (1): 39-52, 2015.

MUSSGNUM, J. H. Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (13): 5407-5418, 2015.

NAGRAL, A. Gaucher disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 4 (1): 37-50, 2014.

NEUPERT, J.; KARCHER, D. & BOCK, R. Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant Journal*, 57 (6): 1140-1150, 2009.

NOVO, J. B.; MORGANTI, L.; MORO, A. M.; PAES LEME, A. F.; SERRANO, S. M.; RAW, I. & HO, P. L. Generation of a Chinese hamster ovary cell line producing recombinant human glucocerebrosidase. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012:875383, 2012.

OPAR, A. 'Pharmers' hope for first plant drug harvest. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10 (2): 81-82, 2011.

ORENSTEIN, M.; BARBOUTH, D.; BODAMER, O. A. & WEINREB, N. J. Patients with type 1 Gaucher disease in South Florida, USA: demographics, genotypes, disease severity and treatment outcomes. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9: 45, 2014.

PATRA, K. P.; LI, F.; CARTER, D.; GREGORY, J. A.; BAGA, S.; REED, S. G.; MAYFIELD, S. P. & VINETZ, J. M. Alga-produced malaria transmission-blocking vaccine candidate Pfs25 formulated with a human use-compatible potent adjuvant induces high-affinity antibodies that block *Plasmodium falciparum* infection of mosquitoes. *Infection and Immunity*, 83 (5): 1799-1808, 2015.

PELLED, D.; TRAJKOVIC-BODENNEC, S.; LLOYD-EVANS, E.; SIDRANSKY, E.; SCHIFFMANN, R. & FUTERMAN, A. H. Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease. *Neurobiology of Disease*, 18 (1): 83-88, 2005.

PHENIX, C. P.; REMPEL, B. P.; COLOBONG, K.; DOUDET, D. J.; ADAM, M. J.; CLARKE, L. A. & WITHERS, S. G. Imaging of enzyme replacement therapy using PET. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (24): 10842-10847, 2010.

POTVIN, G. & ZHANG, Z. Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: a review. *Biotechnology Advances*, 28 (6): 910-918, 2010.

PRÖSCHOLD, T.; MARIN, B.; SCHLÖSSER, U. G. & MELKONIAN, M. Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist*, 152 (4): 265-300, 2001.

PUIGBÒ, P.; GUZMÁN, E.; ROMEU, A. & GARCIA-VALLVÉ, S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 35: W126-W131, 2007.

RASALA, B. A. & MAYFIELD, S. P. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioengineered bugs*, 2 (1): 50-54, 2011.

RASALA, B. A. & MAYFIELD, S. P. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynthesis Research*, 123 (3): 227-239, 2015.

RASALA, B. A.; MUTO, M.; LEE, P. A.; JAGER, M.; CARDOSO, R. M.; BEHNKE, C. A.; KIRK, P.; HOKANSON, C. A.; CREA, R.; MENDEZ, M. & MAYFIELD, S. P. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal*, 8 (6): 719-733, 2010.

RECZEK, D.; SCHWAKE, M.; SCHRÖDER, J.; HUGHES, H.; BLANZ, J.; JIN, X.; BRONDYK, W.; VAN PATTEN, S.; EDMUNDS, T. & SAFTIG, P. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*, 131 (4): 770-783, 2007.

REGGI, S.; MARCHETTI, S.; PATTI, T.; DE AMICIS, F.; CARIATI, R.; BEMBI, B. & FOGHER, C. Recombinant human acid beta-glucosidase stored in tobacco seed is stable, active and taken up by human fibroblasts. *Plant Molecular Biology*, 57 (1): 101-113, 2005.

ROCHA, E. M.; SMITH, G. A.; PARK, E.; CAO, H.; BROWN, E.; HALLETT, P. & ISACSON, O. Progressive decline of glucocerebrosidase in aging and Parkinson's disease. *Annals of clinical and translational neurology*, 2 (4): 433-438, 2015.

ROSALES-MENDOZA, S.; PAZ-MALDONADO, L. M. & SORIA-GUERRA, R. E. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Reports*, 31 (3): 479-494, 2012.

ROSENBERG, J. N.; OYLER, G. A.; WILKINSON, L. & BETENBAUGH, M. J. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 19 (5): 430-436, 2008.

ROSENBLOOM, B. E. & WEINREB, N. J. Gaucher disease: a comprehensive review. *Critical reviews in oncogenesis*, 18 (3): 163-175, 2013.

RUECKER, O.; ZILLNER, K.; GROEBNER-FERREIRA, R. & HEITZER, M. Gaussia-luciferase as a sensitive reporter gene for monitoring promoter activity in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and Genomics*, 280 (2): 153-162, 2008.

SCHAPIRA, A. H. Glucocerebrosidase and Parkinson disease: Recent advances. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 66: 37-42, 2015.

SCHMITZ, J.; POLL, L. W. & VOM DAHL, S. Therapy of adult Gaucher disease. *Haematologica*, 92 (2): 148-152, 2007.

SCHRODA, M. RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. *Current Genetics*, 49 (2): 69-84, 2006.

SCHRODA, M.; BECK, C. F. & VALLON, O. Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal*, 31 (4): 445-455, 2002.

SCHRODA, M.; BLÖCKER, D. & BECK, C. F. The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal*, 21 (2): 121-131, 2000.

SHAALTIEL, Y.; BARTFELD, D.; HASHMUELI, S.; BAUM, G.; BRILL-ALMON, E.; GALILI, G.; DYM, O.; BOLDIN-ADAMSKY, S. A.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L.; FUTERMAN, A. H. & AVIEZER, D. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal*, 5 (5): 579-590, 2007.

SHAALTIEL, Y.; GINGIS-VELITSKI, S.; TZABAN, S.; FIKS, N.; TEKOA, Y. & AVIEZER, D. Plant-based oral delivery of beta-glucocerebrosidase as an enzyme replacement therapy for Gaucher's disease. *Plant Biotechnology Journal*, 13 (8): 1033-1040, 2015.

SHEMESH, E.; DEROMA, L.; BEMBI, B.; DEEGAN, P.; HOLLAK, C.; WEINREB, N. J. & COX, T. M. Enzyme replacement and substrate reduction therapy for Gaucher disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3: CD010324, 2015.

SHIMOGAWARA, K.; FUJIWARA, S.; GROSSMAN, A. & USUDA, H. High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics*, 148 (4): 1821-1828, 1998.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D. & HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7: 539, 2011.

SINCLAIR, G.; PFEIFER, T. A.; GRIGLIATTI, T. A. & CHOY, F. Y. Secretion of human glucocerebrosidase from stable transformed insect cells using native signal sequences. *Biochemistry and Cell Biology*, 84 (2): 148-156, 2006.

SORGE, J.; WEST, C.; WESTWOOD, B. & BEUTLER, E. Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82 (21): 7289-7293, 1985.

SORGE, J. A.; WEST, C.; KUHLE, W.; TREGER, L. & BEUTLER, E. The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons. *American Journal of Human Genetics*, 41 (6): 1016-1024, 1987.

SPECHT, E.; MIYAKE-STONER, S. & MAYFIELD, S. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters*, 32 (10): 1373-1383, 2010.

SU, Z. L.; QIAN, K. X.; TAN, C. P.; MENG, C. X. & QIN, S. Recombination and heterologous expression of allophycocyanin gene in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37 (10): 709-712, 2005.

SUN, M.; QIAN, K.; SU, N.; CHANG, H.; LIU, J. & SHEN, G. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnology Letters*, 25 (13): 1087-1092, 2003.

SURZYCKI, R.; GREENHAM, K.; KITAYAMA, K.; DIBAL, F.; WAGNER, R.; ROCHAIX, J. D.; AJAM, T. & SURZYCKI, S. Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals*, 37 (3): 133-138, 2009.

TAN, C. H.; SHOW, P. L.; CHANG, J. S.; LING, T. C. & LAN, J. C. Novel approaches of producing bioenergies from microalgae: A recent review. *Biotechnology Advances*, 33 (6): 1219-1227, 2015.

TAUTZ, D. & RENZ, M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 132 (1): 14-19, 1983.

TRAN, M.; HENRY, R. E.; SIEFKER, D.; VAN, C.; NEWKIRK, G.; KIM, J.; BUI, J. & MAYFIELD, S. P. Production of anti-cancer immunotoxins in algae: ribosome inactivating proteins as fusion partners. *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (11): 2826-2835, 2013.

TRAN, M.; ZHOU, B.; PETTERSSON, P. L.; GONZALEZ, M. J. & MAYFIELD, S. P. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. *Biotechnology and Bioengineering*, 104 (4): 663-673, 2009.

WALKER, T. L.; PURTON, S.; BECKER, D. K. & COLLET, C. Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Reports*, 24 (11): 629-641, 2005.

WANG, X.; BRANDSMA, M.; TREMBLAY, R.; MAXWELL, D.; JEVNIKAR, A. M.; HUNER, N. & MA, S. A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). *BMC Biotechnology*, 8: 87, 2008.

WIJFFELS, R. H.; KRUSE, O. & HELLINGWERF, K. J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, 24 (3): 405-413, 2013.

WU, J.; HU, Z.; WANG, C.; LI, S. & LEI, A. Efficient expression of green fluorescent protein (GFP) mediated by a chimeric promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 26 (3): 242-247, 2008.

YANG, Z.; LI, Y.; CHEN, F.; LI, D.; ZHANG, Z.; LIU, Y.; ZHENG, D.; WANG, Y. & SHEN, G. Expression of human soluble TRAIL in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Chinese Science Bulletin*, 51 (14): 1703-1709, 2006.

ZHANG, R.; PATENA, W.; ARMBRUSTER, U.; GANG, S. S.; BLUM, S. R. & JONIKAS, M. C. High-Throughput Genotyping of Green Algal Mutants Reveals Random Distribution of Mutagenic Insertion Sites and Endonucleolytic Cleavage of Transforming DNA. *The Plant Cell*, 26 (4): 1398-1409, 2014.

ZIMRAN, A. How I treat Gaucher disease. *Blood*, 118 (6): 1463-1471, 2011.

7. Curriculum Vitae

Guilherme Pizzoli

e-mail: guilhermepz@yahoo.com.br

Formação acadêmica/titulação

- 2013** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
Título: Expressão do Gene da Glicocerebrosidase Humana em *Chlamydomonas reinhardtii*
Orientador: Dr. Giancarlo Pasquali
- 2005 - 2007** Ênfase em Farmácia Bioquímica – Análises Clínicas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
- 2001 - 2005** Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Formação complementar

- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Introdução à PCR em tempo real: Princípios Básicos e Aplicações para Análises de Expressão Gênica (Carga horária: 15h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Capacitação em Assistência Farmacêutica para Profissionais do SUS (Carga horária: 16h).
Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, São Paulo, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Terapia Celular e Manipulação Genética (Carga horária: 9h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
- 2004 - 2004** Extensão universitária em Biologia Molecular Aplicada Às Ciências da Saúde (Carga horária: 9h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Strategy In Search Of Bioactive Plants Constituents (Carga horária: 8h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

- 2003 - 2003** Extensão universitária em Introdução a Homeopatia (Carga horária: 20h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Ciclo de Palestras em Toxicologia (Carga horária: 10h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
- 2003 - 2003** Extensão universitária em Avaliação Farmacológica de Plantas Medicinais (Carga horária: 12h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
- 2003 - 2003** Extensão universitária em Atualidades em Genética (Carga horária: 15h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
- 2003 - 2003** Extensão universitária em IX Curso de Neuroanatomia Topográfica (Carga horária: 24h).
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
- 2002 - 2002** Curso de curta duração em Interações Medicamentos X Alimentos (Carga horária: 6h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Atuação profissional

Hospital Cristo Redentor S/A – Grupo Hospitalar Conceição (GHC)

Vínculo institucional

2006 - Atual Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico.

Iniciação Científica

- 2002 - 2003** Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
Investigação Fitoquímica em *Hippeastrum vittatum* e *Hippeastrum striatum* (Alcalóides)
Orientador: Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi
- 2003 - 2004** Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
Análise de Antocianos e Flavonóides em Frutos
Orientadora: Dra. Amelia Teresinha Henriques

2004 - 2006 Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, Centro de Biotecnologia
–Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
Projeto Genolyptus – Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de Eucalyptus
Orientador: Dr. Giancarlo Pasquali

Experiência Didática

2015 Curso Prático de Extensão para Professores e Estudantes do Ensino Médio - Curso de Férias - edição: A Célula, 2015.

Prêmios e títulos

2005 Prêmio Alfredo Leal do Mérito Acadêmico, por haver obtido o primeiro lugar na Turma de Formandos do primeiro semestre do ano de 2005, do Curso de Farmácia, Faculdade de Farmácia - UFRGS

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. PICOLOTTO, P. R. D., **PIZZOLI, G.**, PASQUALI, G.
Design and Cloning of the Human Glucocerebrosidase Gene for Plant Transformation and Expression In: IV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 2013, Bento Gonçalves - RS.
RESUMOS DO IV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 2013.

2. **PIZZOLI, G.**, PASQUALI, G.
Expressão da enzima glicocerebrosidase humana em *Chlamydomonas reinhardtii* In: IV Latin American Congress of Algae Biotechnology & Workshop of the National Network of Marine Algae Biotechnology, 2013, Florianópolis, SC.
Resumos do IV Latin American Congress of Algae Biotechnology & Workshop of the National Network of Marine Algae Biotechnology, 2013.

3. **PIZZOLI, G.**, PASQUALI, G.
Expression of an artificial human glucocerebrosidase gene in *Chlamydomonas reinhardtii* In: IV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 2013, Bento Gonçalves - RS.
RESUMOS DO IV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 2013.

4. PICOLOTTO, P. R. D., **PIZZOLI, G.**, PASQUALI, G.
Design and cloning of a synthetic gene encoding human glucocerebrosidase for the genetic transformation of plants In: 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia e Rodada de Negócios, 2012, Guarujá, SP.
Resumos do 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia e Rodada de Negócios, 2012.
5. **PIZZOLI, G.**, AMORIM, H. O. F., LINDENMEYER, L. P., RAFFO, A. M. V., NASCIMENTO, M. E. C., VALENTE, R. S., SIEBERT, C. F. M., TELES, M. S.
Avaliação farmacêutica das prescrições em um hospital de trauma In: XX Congresso Pan-Americano de Farmácia, 2010, Porto Alegre, RS.
Resumos do XX Congresso Pan-Americano de Farmácia, 2010.
6. **PIZZOLI, G.**, AMORIM, H. O. F., LINDENMEYER, L. P., RAFFO, A. M. V., NASCIMENTO, M. E. C., VALENTE, R. S., SIEBERT, C. F. M., TELES, M. S.
Verificação dos medicamentos utilizados antes da internação pelos pacientes em hospital de trauma In: XX Congresso Pan-Americano de Farmácia, 2010, Porto Alegre, RS.
Resumos do XX Congresso Pan-Americano de Farmácia, 2010.
7. MARIN, R., LIMBERGER, R. P., **PIZZOLI, G.**, RASEIRA, M. C. B., ZUANAZZI, J. A. S., HENRIQUES, A. T.
Flavorizantes e antocianos de GUABIROBA (*Campomanesia xanthocarpa*) e MIRTILO (*Vaccinium myrtillus*) In: 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador.
27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - Livro de Resumos, 2004.
8. SILVA, A. F. S., **PIZZOLI, G.**, ANDRADE, J. P., LIMBERGER, R. P., SOBRAL, M., HENRIQUES, A. T., ZUANAZZI, J. A. S.
Alkaloids From *Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) Herbert and *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore (Amaryllidaceae) In: XII Congresso Ítalo-Latino-Americano de Etnomedicina Nuno Álvares Pereira, 2003, Rio de Janeiro.
XII Congresso Ítalo-Latino-Americano de Etnomedicina Nuno Álvares Pereira - Livro de Resumos, 2003. p.194 - 194
9. **PIZZOLI, G.**, SILVA, A. F. S., HENRIQUES, A. T., ZUANAZZI, J. A. S.
Investigação Fitoquímica de *Hippeastrum striatum* In: XXIII Concurso Acadêmico de Pesquisa Científica - XXVIII Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos, 2003, Porto Alegre.
XXVIII Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos - Programa e Resumos, 2003.
10. ANDRADE, J. P., **PIZZOLI, G.**, SILVA, A. F. S., HENRIQUES, A. T., ZUANAZZI, J. A. S.
Investigação Química em *Hippeastrum vittatum* (L'Hér) Herbert In: XV Salão de Iniciação Científica, 2003, Porto Alegre.
Salão de Iniciação Científica - Livro de Resumos. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003.
11. ANDRADE, J. P., **PIZZOLI, G.**, SILVA, A. F. S., HENRIQUES, A. T., ZUANAZZI, J. A. S.

Investigação Química em *Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) Herbert In: XXIV Concurso Acadêmico de Pesquisa Científica - XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos, 2003, Porto Alegre.

XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos - Resumos, 2003.

12. **PIZZOLI, G., ANDRADE, J. P., SILVA, A. F. S., HENRIQUES, A. T., ZUANAZZI, J. A. S.**

Isolamento dos Alcalóides do Extrato n-Butanólico de *Hippeastrum vittatum* Empregando CLAE In: XV Salão de Iniciação Científica, 2003, Porto Alegre.

Salão de Iniciação Científica - Livro de Resumos. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003.

13. **PIZZOLI, G., SILVA, A. F. S., ANDRADE, J. P., HENRIQUES, A. T., ZUANAZZI, J. A. S.**

Isolamento dos Alcalóides do Extrato n-Butanólico de *Hippeastrum vittatum* (L'Her) Herbert (Amaryllidaceae) Empregando CLAE In: XXIV Concurso Acadêmico de Pesquisa Científica - XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos, 2003, Porto Alegre.

XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos - Resumos, 2003.

14. **PIZZOLI, G., SILVA, A. F. S., HENRIQUES, A. T., ZUANAZZI, J. A. S.**

Investigação Fitoquímica de *Hippeastrum striatum* (L'Hér) Herbert In: XIV Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre.

Livro de Resumos - XIV Salão de Iniciação Científica, 2002.

Apresentação de trabalhos e palestras

1. **PIZZOLI, G.**

Administração de medicamentos via sonda, 2014. (Seminário, Apresentação de Trabalho)

2. **PIZZOLI, G., RAFFO, A. M. V., AMORIM, H. O. F., NASCIMENTO, M. E. C., VALENTE, R. S.**

Avaliação farmacêutica das prescrições em um hospital de trauma, 2013. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

3. **PIZZOLI, G.**

Cuidados na Utilização de Medicamentos, 2009. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)