

OPTIMIZACIÓN DE PROMOTORES ENDÓGENOS DE CÉLULAS CHO-K1 PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CÉLULAS EUCARIOTAS

Beckley, Belén

Centro Biotecnológico del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral
Director/a: Gugliotta, Agustina
Codirector/a: Prieto, Claudio

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave: promotores endógenos eucariotas, células CHO-K1, producción de proteínas recombinantes

INTRODUCCIÓN

La generación de líneas celulares recombinantes productoras de proteínas terapéuticas resulta de gran interés para la industria farmacéutica, ya que constituye el primer paso del proceso para el desarrollo de productos aplicados tanto en medicina humana como animal (Sahreem *et al.*, 2023). Las células animales, específicamente las células CHO-K1, dominan el campo de producción de bioterapéuticos, ya que poseen la maquinaria necesaria para llevar a cabo la expresión y secreción de proteínas recombinantes complejas en donde es necesario un correcto procesamiento y plegamiento, así como también el desarrollo adecuado de modificaciones co y postraduccionales (Sergeeva, 2020).

Uno de los obstáculos más comunes en la producción de proteínas recombinantes heterólogas en células de mamíferos está asociado a la inestabilidad de expresión que evidencian los clones celulares, lo cual se puede mejorar mediante ingeniería de los vectores plasmídicos. En este sentido, el diseño del cassette de expresión que será empleado para la generación de la línea celular recombinante, y, particularmente, la elección del promotor, es crucial para un proceso exitoso (Jazayeri *et al.* 2018).

Tradicionalmente se han empleado promotores constitutivos, de origen viral, para la generación de líneas celulares recombinantes productoras de proteínas de interés bioterapéutico, tal es el caso del promotor SV40 y el promotor CMV (Qin *et al.* 2010). Estos promotores son fuertes y permiten alcanzar elevados niveles de expresión, pero su empleo presenta ciertas desventajas, ya que pueden causar estrés celular y sufrir silenciamiento epigenético. Los promotores endógenos de células eucariotas constituyen una alternativa promisoriosa, ya que son capaces de responder a las condiciones del cultivo celular, al utilizar elementos de señalización y factores de unión al ADN propios de la célula, evitando problemas de inestabilidad de expresión (Thaisuchat *et al.* 2011).

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se identificaron promotores endógenos de células eucariotas a partir de genes que evidenciaron altos niveles de expresión en células CHO-K1 cultivadas en condiciones típicas de un bioproceso de producción, es decir, cultivo en perfusión en medio libre de suero fetal bovino (Tossolini *et al.*, 2022). La subsecuente caracterización de los promotores endógenos demuestra el potencial de dos de los promotores, denominados PromA y PromB, por presentar elevada actividad transcripcional respecto del promotor CMV+E, tradicionalmente empleado en procesos de producción.

Título del proyecto: Producción de ectodominios de spike de variantes de preocupación de SARS-CoV-2 y diseño racional de antígenos vacunales como estrategia de inmunización

Instrumento: PICTO-COVID Inmunización 0003

Año de la convocatoria: 2021

Organismo financiador: AGENCIA I+D+i y FONCYT

Director/a: Dr. Claudio Cesar Prieto

OBJETIVO

Estudiar la actividad transcripcional y optimizar el tamaño de promotores endógenos de células CHO-K1 mediante el acortamiento racional de su secuencia.

METODOLOGÍA

Estudio de secuencias promotoras y estrategias de optimización

El análisis bioinformático de las secuencias de dos promotores denominados PromA y PromB se realizó con el objetivo de identificar sitios de unión a factores de transcripción (*transcription factor binding sites* – TFBS) activadores de la transcripción. Para dicho análisis se emplearon diferentes herramientas disponibles online, tal es el caso de AliBaba2.1 y PROMO. Los TFBS son importantes para la unión de factores de transcripción específicos que permiten activar la expresión de genes corriente abajo. Además, el análisis realizado con el software EMBOSS cpplot permitió la identificación de regiones ricas en GC (islas CpG) que desempeñan un papel clave en el inicio de la transcripción.

Es importante mencionar que una publicación reciente describe el uso exitoso de una región de menor longitud de PromA, demostrando la factibilidad de su optimización (Tanemura *et al.*, 2022). Las diferencias entre la secuencia reportada en la bibliografía y la empleada en el presente trabajo, alientan la optimización del promotor. En esta publicación se encuentran identificados algunos TFBS, por lo que también fueron considerados para nuestro análisis.

El estudio de TFBS realizado *in silico*, así como también la información disponible en la bibliografía y estudiada en el marco del presente trabajo, condujeron al diseño de promotores optimizados.

Diseño y construcción de vectores plasmídicos conteniendo las secuencias de los promotores endógenos optimizados dirigiendo la expresión de la proteína ZsGreen1

En base al estudio realizado anteriormente, se llevó a cabo la amplificación por PCR de regiones de menor longitud de cada uno de los promotores. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos que permiten amplificar las regiones de interés a partir de secuencias originales: pPromA::RBD y pPromB::RBD. Los oligonucleótidos permiten adicionar sitios de corte para enzimas de restricción para favorecer el posterior clonado. Teniendo en cuenta que los clonados se realizan en el vector pZsGreen1-1, se evaluaron las enzimas disponibles en el sitio de múltiple clonado, así como también la ausencia de sitios de corte para las mismas en las secuencias de los promotores en estudio. En el caso de PromA se incorporaron los sitios de corte para *KpnI* y *BamHI*, mientras que en el caso de PromB los sitios para *KpnI* y *EcoRI*. Luego de la amplificación, se realizó la digestión de las secuencias y del vector de destino con las enzimas de restricción correspondientes, y su posterior ligación. El vector pZsGreen1-1 contiene la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente ZsGreen1 optimizada, y no posee secuencia promotora que dirija su expresión, por lo que es ideal para monitorear la actividad de diferentes promotores, que se insertan en el sitio de múltiple clonado (MSC). Con los plásmidos generados se transformaron bacterias *E. coli* para obtener clones.

Los plásmidos obtenidos se verificaron mediante digestión con las enzimas de restricción utilizadas para el clonado.

Evaluación de los vectores plasmídicos construidos mediante ensayos de transfección transitoria en células eucariotas

La introducción de ADN exógeno en células CHO-K1 se realiza mediante lipofección (Felgner *et al.*, 1987), con el lípido catiónico Lipofectamine 3000, según el protocolo recomendado por el fabricante. A las 72 h de cultivo posterior a la transfección, la expresión de la proteína verde fluorescente se analiza empleando el citómetro de flujo Guava

EasyCyte (Millipore) y microscopio de fluorescencia (Nikon). Para la transfección de células CHO-K1 se utilizan los vectores conteniendo las secuencias optimizadas de cada uno de los promotores. Los plásmidos conteniendo la secuencia original de los promotores (pPromA::ZsGreen1 y pPromB::ZsGreen1) se emplean como control. Este ensayo actualmente se encuentra en desarrollo. Los resultados serán oportunamente presentados.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Optimización de PromA y PromB mediante análisis *in silico*

Luego de realizar una representación gráfica de los sitios potenciales de unión a factores de transcripción encontrados al realizar el análisis bioinformático, se decidió proceder a la optimización de los promotores intentando preservar las regiones que contienen mayor abundancia de TFBS, incluyendo, en la medida de lo posible, islas GC y respetando el sitio de inicio de la transcripción. Para PromA se diseñaron tres secuencias, denominadas PromA1 (649 pb), PromA2 (540 pb) y PromA3 (420 pb) (Figura 1A), y para PromB se diseñaron dos secuencias, denominadas PromB1 (779 pb) y PromB2 (642 pb) (Figura 1B).

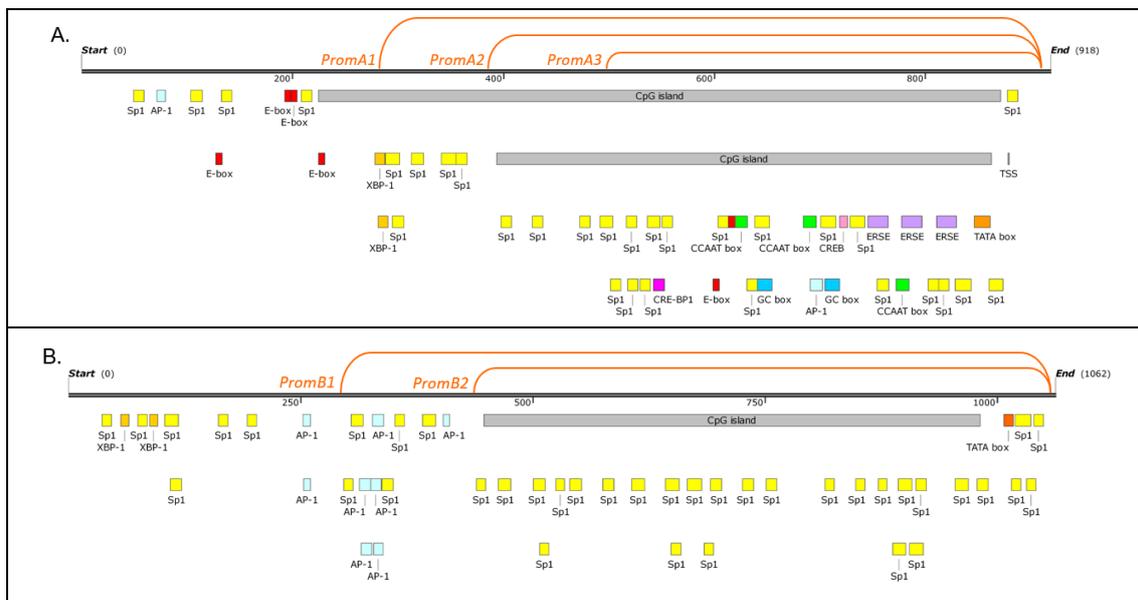


Figura 1. Sitios potenciales de unión a factores de transcripción en PromA (A) y PromB (B). Se muestra la localización de motivos Sp1, AP-1, XBP1, ERSE, CREB, CRE-BP1, E-box, GC box, CCAAT box, y de islas CpG. En naranja se ven las regiones elegidas para su optimización.

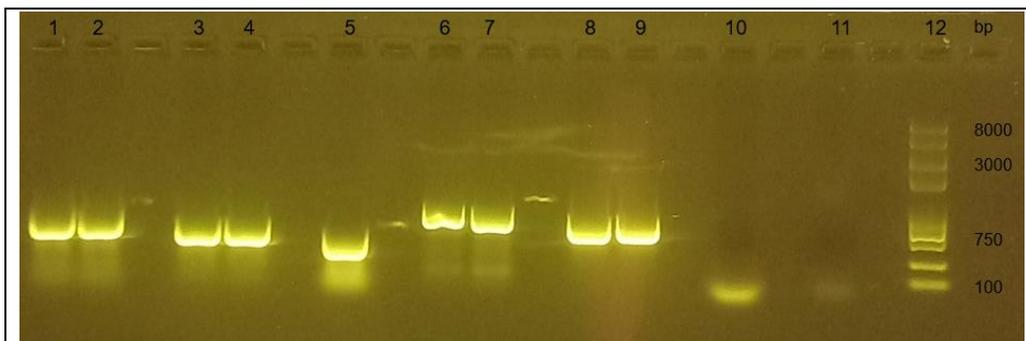


Figura 2. Productos de PCR provenientes de la amplificación de PromA1, 2, 3 y PromB1, 2. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Orden de siembra: carriles 1 y 2: PromA1; carriles 3 y 4: PromA2; carril 5: PromA3; carriles 6 y 7: PromB1; carriles 8 y 9: PromB2; carril 10: control negativo PromA; carril 11: control negativo PromB; carril 12: Trans2K®Plus II DNA Marker.

Una vez definidas las secuencias, se diseñaron los primers y con los mismos se amplificaron mediante PCR las secuencias optimizadas de los promotores a partir de los vectores pPromA::RBD y pPromB::RBD. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la Figura 2 se observa el resultado de la electroforesis realizada, y como se puede ver en todos los casos se logró amplificar un fragmento de tamaño acorde al esperado.

Construcción de los vectores plasmídicos conteniendo la secuencia codificante de la proteína ZsGreen1 bajo el control de los promotores optimizados

El vector pZsGreen1-1 así como las secuencias de los promotores optimizados fueron digeridos empleando las enzimas de restricción correspondientes en cada caso. Posteriormente se procedió a la ligación y transformación de células competentes *Escherichia coli* TOP10. Los clones obtenidos fueron verificados mediante digestión enzimática con las mismas enzimas de restricción que fueron utilizadas para el clonado. En la Figura 3 se puede observar el resultado de la digestión realizada para los clones obtenidos de los diferentes PromA y PromB. La banda liberada como consecuencia del corte se corresponde con la secuencia clonada.

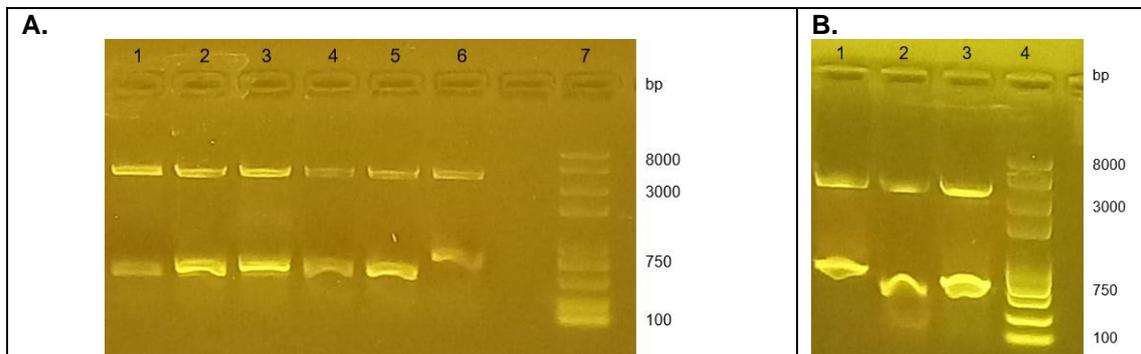


Figura 3. Análisis de clones bacterianos positivos mediante digestión y electroforesis en gel de agarosa al 1%. A) Orden de siembra: carril 1: pPromA3::ZsGreen1 clones 1 y 3; carriles 2, 3, 4 y 5: pPromA2::ZsGreen1 clones 1, 2, 3 y 4; carril 6: pPromB1::ZsGreen1 clon 1; carril 7: Trans2K@Plus II DNA Marker. B) Orden de siembra: carriles 1, 2 y 3: pPromA1::ZsGreen1 clones 1, 2 y 3; carril 4: Trans2K@Plus II DNA Marker.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M., 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84:7413–7417.
- Jazayeri, S. H., Amiri-Yekta, A., Bahrami, S., Gourabi, H., Sanati, M. H., Khorramizadeh, M. R., 2018. Vector and cell line engineering technologies toward recombinant protein expression in mammalian cell lines. *Appl Biochem Biotechnol*, 185:986–1003.
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hular, I., Xiang, A. P., Ren, B. Z., Lahn, B. T., 2010. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One*, 5:3–6.
- Sahreen, S., Sharif, S., Ahmad, H., Mukhtar, H., 2023. Comparison of host expression systems used for efficient recombinant proteins production. *Proc Pakistan Acad Sci Part B*, 60:5–28.
- Sergeeva, D., 2020. CRISPR/Cas9 as a genome editing tool for targeted gene integration in CHO cells. *Methods Mol Biol*, Chapter 13, 1961:213–232.
- Thaisuchat, H., Baumann, M., Pontiller, J., Hesse, F., Ernst, W., 2011. Identification of a novel temperature sensitive promoter in CHO cells. *BMC Biotechnol*, 11:51.
- Tossolini, I., Gugliotta, A., López Díaz, F., Kratje, R., Prieto, C., 2022. Screening of CHO-K1 endogenous promoters for expressing recombinant proteins in mammalian cell cultures. *Plasmid* 119–120.