

APLICACIÓN DE UNA TECNOLOGÍA DE RECOMBINACIÓN SITIO ESPECÍFICA (RMCE) EN CÉLULAS CHO-K1 PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *HOTSPOTS*

Ardila Milena

Estudiante de Licenciatura en Biotecnología. Cientibecaria
Laboratorio de Cultivos Celulares, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras Claves: CHO-K1, RMCE, bioterapéuticos.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la mayoría de las proteínas recombinantes de uso terapéutico son producidas principalmente empleando cultivos de células animales (CHO-K1, HEK293 y BHK-21). Esto se debe a su capacidad de introducir modificaciones co- y post-traduccionales. Sin embargo, una de las desventajas asociadas al uso de estas células es que presentan bajas productividades volumétricas (Huang y col., 2007).

Teniendo en cuenta que el tratamiento de diversas enfermedades requiere el empleo de dosis elevadas y frecuentes de las proteínas terapéuticas para alcanzar el efecto deseado, el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan identificar sitios en el genoma de diferentes líneas celulares con elevadas y constantes productividades específicas es de gran importancia (Nehlsen y col., 2009). La escasa presencia de dichos sitios, denominados "*hotspots*", en el genoma celular conduce a la necesidad de desarrollar metodologías que permitan no sólo identificarlos sino también marcarlos para que posteriormente puedan ser reutilizados a través de la introducción de diferentes transgenes que codifiquen para diversas proteínas recombinantes (Mueller y col., 2003).

La metodología de intercambio de cassette mediado por una recombinasa o RMCE (*Recombinase Mediated Cassette Exchange*) es un método de recombinación sitio específica que permite la introducción de un transgen en un sitio previamente caracterizado del genoma. La técnica se basa en una primera etapa de "*tagging*" que consiste en la generación de una línea celular mediante la integración en su genoma de un cassette de expresión que posee en sus extremos un par heterólogo de sitios *target* de recombinación (RTs). A partir de la línea generada se obtienen clones que deben ser caracterizados en función del nivel y estabilidad de expresión del transgen y su factibilidad de realizar la recombinación. Posteriormente, se realiza la segunda etapa de "*targeting*" que se basa en el intercambio de cassette entre dos secuencias que poseen los mismos sitios RTs en sus extremos. Una de ellas se encuentra en el genoma mientras que la otra está contenida dentro de un plásmido. La encargada de llevar adelante este procedimiento es la enzima recombinasa F1p. Es muy importante considerar que para favorecer el éxito de la metodología y evitar grandes rearrreglos en el genoma celular se debe introducir una única copia del transgen en el genoma celular (Wirth y col., 2007).

Proyecto: Generación de líneas celulares animales productoras de bioterapéuticos basadas en una tecnología de recombinación sitio específica (RMCE)

Director del proyecto: Claudio Prieto

Director del becario: Claudio Prieto

Codirector del becario: Agustina Gugliotta

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo general identificar regiones transcripcionalmente activas o “hotspots” en cromosomas de células CHO-K1. Como objetivos particulares se propone emplear vectores lentivirales de tercera generación como herramientas biotecnológicas y un sistema de recombinación sitio dirigido (RMCE) para la generación de clones productores. Se utilizan las proteínas reporteras GFP y RFP y un anticuerpo recombinante como modelo de estudio.

METODOLOGÍA

Ensamblado de partículas lentivirales

Las partículas lentivirales se generaron por transfección transiente de células HEK293, empleando Lipofectamine 2000 (Invitrogen), con 4 plásmidos: pRSV-Rev, pMD2.G, pMDLg/pRRE y el vector de transferencia conteniendo el cassette HC-GFP-LC (Figura 1).

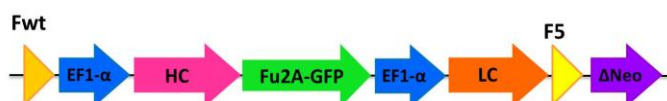


Figura 1: Representación esquemática del vector *Tagging*. EF1- α : *Promotor Elongation Factor 1 alpha*. HC: *Heavy Chain*. GFP: *Green Fluorescent Protein*. LC: *Light Chain*. RTs: Fwt y F5.

Generación de líneas celulares

Para la generación de líneas celulares, se realizó la transducción de células CHO-K1 mediante el agregado de los lentivirus a razón de 0,001 Unidad de Transducción (UT) por célula. A las 24 horas se removieron las partículas de los cultivos y se agregó medio de cultivo fresco. Posteriormente, se realizó la selección de las líneas recombinantes adicionando diferentes concentraciones de puromicina al medio.

Clonado de la línea celular generada

La línea celular seleccionada fue clonada empleando en primera instancia diluciones seriadas que permitieron distribuir 10 células/pozo. Los multiclonos obtenidos fueron analizados mediante citometría de flujo, ELISA y microscopia de fluorescencia. Una vez seleccionados aquellos que contenían alta expresión de GFP y del anticuerpo se procedió a clonarlos empleando el método de dilución límite. El análisis y selección de los clones se realizó empleando las mismas metodologías.

Los clones estables que presentaron mayor productividad de la proteína reportera y del anticuerpo fueron seleccionados para continuar con los experimentos de reemplazo de secuencia en forma sitio específica (RMCE).

RMCE

Para los ensayos de recombinación de los clones se realizó una co-transfección mediante el uso de lípidos catiónicos (Lipofectamine 2000, Invitrogen) empleando el vector que codificaba para la enzima recombinasa Flp (Invitrogen) y el vector de targeting, que contiene el promotor CMV seguido de la secuencia codificante para la proteína reportera RFP y el ATG que permite la expresión de la resistencia a neomicina (Figura 2). Para realizar la selección agregamos diferentes concentraciones

del antibiótico al medio de cultivo. Mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo se fue analizando el resultado de dicho intercambio.



Figura 2: Representación esquemática del vector *Targeting*. CMV: *Promotor Cytomegalovirus*. RFP: *Red Fluorescent Protein*. RTs: Fwt y F5.

RESULTADOS

El ensamblado de partículas lentivirales permitió obtener un lote de lentivirus conteniendo 2×10^5 UT/ml que fueron empleadas para la transducción de células CHO-K1 a razón de 0,004 UT/cél. La línea celular generada fue sometida a diferentes etapas de presión selectiva empleando concentraciones crecientes de puomicina (10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). Se observó un aumento en la intensidad de expresión de GFP a medida que se incrementó la concentración de antibiótico, siendo la línea celular presionada con 100 $\mu\text{g/ml}$ la que evidenció una mayor proporción de células con intensidades de GFP superiores a 10^3 Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (UA) (**Figura 3**).

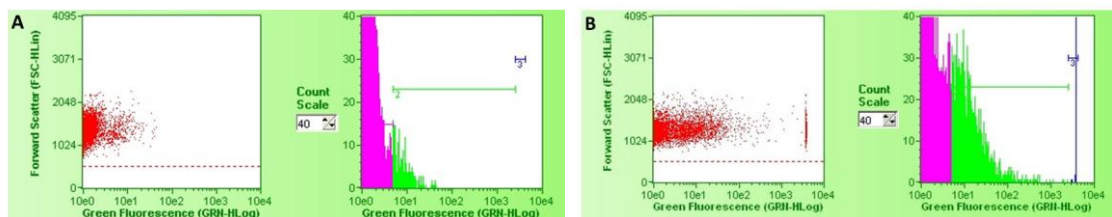


Figura 3: Citometría de flujo de las líneas celulares generadas mediante transducción. **A:** Células CHO-K1 transducidas sin presión selectiva. **B:** Células seleccionadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de puomicina.

El multiclonado de la línea celular presionada con 100 $\mu\text{g/ml}$ de puomicina permitió obtener 480 policlones (**Figura 4 A**), de los cuales solo un 1% (3 clones) evidenció un 35% de células capaces de expresar GFP con una intensidad superior a 10^3 UA (**Figura 4 B**). El anticuerpo sólo fue detectado y cuantificado a partir de sobrenadante de cultivo proveniente de uno de ellos. Los demás policlones analizados evidenciaron porcentajes e intensidades de GFP elevados pero resultaron ser negativos para la expresión del anticuerpo (**Tabla 1**).

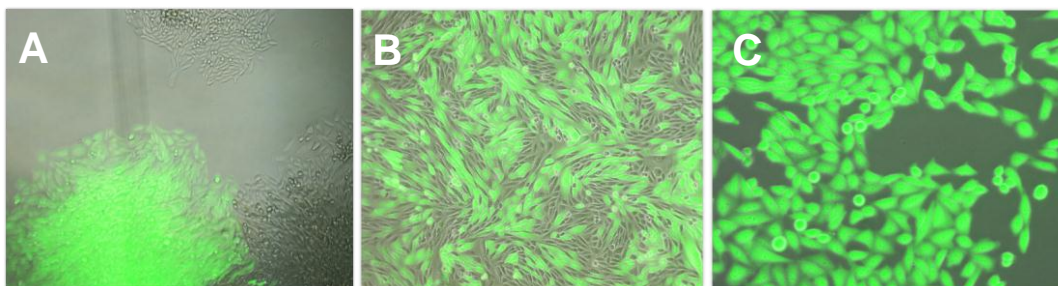


Figura 4: Microscopía de fluorescencia. **(A)** Policlón, 100X **(B)** Policlón seleccionado, 100X **(C)** Clon seleccionado, 200X.

Tabla 1: Productividad específica de anticuerpo y expresión de GFP de los policlones.

Policlon	Productividad Específica (pcd)	%GFP Total	%GFP en marker 2	%GFP en marker 3
P1E5	0,023	92	61	31
P2F11	n/d	97	24	73
P5H7	n/d	99	26	73

El clonado del policlon P1E5 permitió obtener 131 clones los cuales fueron analizados mediante ELISA sándwich y microscopia de fluorescencia. Si bien se esperaba encontrar una gran cantidad de clones que expresaran el fenotipo buscado (porcentaje de GFP superior a 10^3 UA y presencia del anticuerpo), solo dos de ellos lo evidenciaron (**Figura 4 C**). También se estudiaron dos clones con alta expresión de GFP pero ausencia del anticuerpo.

La co-transfección de los 4 clones seleccionados permitió evaluar su capacidad para realizar exitosamente procesos de RMCE. La expresión de RFP durante períodos prolongados de tiempo así como también la resistencia a neomicina permitieron confirmar la utilidad de esta tecnología (**Figura 5**).

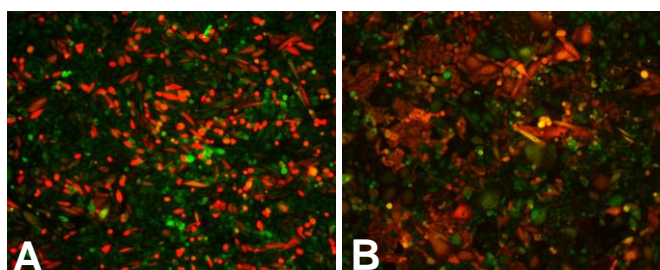


Figura 5: Microscopía de Fluorescencia. **(A)** Cultivo de células co-transfectadas, 100X. **(B)** Cultivo de células seleccionadas durante 72hs con 2 mg/ml de neomicina, 100X.

CONCLUSIONES

Se lograron generar líneas celulares recombinantes productoras del anticuerpo y la proteína reportera. La selección de las mismas con el antibiótico puromicina permitió enriquecer la población de interés y a partir de ella obtener clones celulares con las características de productividad y estabilidad deseadas. Se continúa caracterizando los clones obtenidos.

En cuanto a la tecnología de recombinación sitio específica (RMCE) pudo ser realizada exitosamente en todos los clones. Se continúa con la selección y análisis de productividad.

BIBLIOGRAFÍA

- Huang Y., Li Y., Wang Y., Gu X., Wang Y., Shen B. F., 2007. An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression. *Journal of Immunologic Methods*, 322, 28-39.
- Mueller P. P., Wirth D., Unsinger J., Hauser H., 2003. Genetic approaches to recombinant protein production in mammalian cells. In Parekh, S.R. and Vinci, V.A. (eds.), *Handbook of Industrial Cell Culture: Mammalian, Microbial and Plant Cells*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2-50.
- Nehlsen K., Schucht R., da Gama-Norton L., Krömer W., Baer A., Cayli A., Hauser H., Wirth D., 2009. Recombinant protein expression by targeting pre-selected chromosomal loci. *BMC Biotechnology*, 9, 100.
- Wirth D., Gama-Norton L., Riemer P., Sandhu U., Schucht R., Hauser H., 2007. Road to precision: recombinase-based targeting technologies for genome engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 411-419.