



GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES CHO-K1 APTAS PARA RECOMBINACIÓN SITIO ESPECÍFICA DE SECUENCIAS TRANSGÉNICAS.

Daj Daró, Giuliana.

*Centro Biotecnológico del Litoral FBCB - UNL
Directora: Gugliotta, Agustina
Codirector: Prieto, Claudio*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Transfección, CHO-K1. RMCE.

INTRODUCCIÓN

Desde que la FDA (Food and Drug Administration, EE.UU.) aprobó la comercialización de la insulina humana recombinante, más de 200 productos bioterapéuticos han sido desarrollados con el objetivo de mejorar la calidad de vida de millones de pacientes en todo el mundo, revolucionando el tratamiento de una gran variedad de enfermedades (Walsh, 2014).

Actualmente, la mayoría de las proteínas recombinantes de uso terapéutico son producidas principalmente empleando cultivos de células animales (CHO-K1, HEK293 y BHK-21), aprovechando 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, lo cual se encuentra estrechamente relacionado al método empleado para la modificación genética de las mismas (Lai y col., 2013.).

El método más utilizado en la investigación clínica para la generación de líneas celulares productoras de proteínas recombinantes es la transducción, mediada por virus o partículas pseudovirales. Esta metodología resulta ser altamente eficiente y sencilla para lograr una elevada expresión de transgenes de manera sostenible. Sin embargo, los principales inconvenientes de esta técnica radican en su citotoxicidad, pudiendo causar mutaciones por inserción que alteren la expresión de genes esenciales (Kim y Eberwine, 2010).

No se encontró bibliografía sobre la disponibilidad de proteínas recombinantes de interés terapéutico en el mercado, producidas a partir de clones celulares obtenidos mediante el empleo de partículas pseudovirales como herramienta de modificación genética. Por este motivo, la transfección resulta ser el método de elección.

Los métodos de transfección química son los más utilizados en la investigación contemporánea. Diversos compuestos químicos que presentan cargas positivas pueden interactuar con el ADN que presenta cargas negativas, formando complejos con carga neta positiva que son atraídos a la membrana celular. El ADN transfectado se expresa

inicialmente de manera transitoria pero debe ingresar al núcleo e integrarse al genoma para lograr su expresión estable (Kaestner y col., 2015).

Teniendo en cuenta que para el tratamiento de diversas enfermedades se requiere del 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 detección de dichos sitios, denominados “hotspots” presenta ciertas dificultades debido a su escasa presencia en el genoma celular. Por este motivo, resulta de gran importancia llevar a cabo no sólo la identificación de hotspots sino también su marcación con etiquetas que puedan ser reconocidas por enzimas específicas, denominadas recombinasas. Las mismas permitirán llevar a cabo la reutilización del hotspot encontrado mediante la introducción sitio específica de diferentes transgenes que codifiquen para diversas proteínas recombinantes (Lawson, (2010). El intercambio de cassette mediado por una recombinasa (RMCE) constituye una herramienta de ingeniería de genomas que emplea una enzima recombinasa y resulta de gran utilidad para la generación de líneas celulares recombinantes (Wirth y col., 2007).

OBJETIVOS

- Diseño y construcción de un vector plasmídico como herramienta biotecnológica para la búsqueda y marcación de regiones transcripcionalmente activas o “hotspots” en el genoma de células animales
- Identificación de “hotspots” en cromosomas de células CHO-K1, empleando la transfección como método de transferencia de material genético.

Título del proyecto: Desarrollo de una plataforma versátil para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de interés en salud humana y animal.

Instrumento: Universidades Agregando Valor.

Año convocatoria: 2017.

Organismo financiador: Ministerio de Educación de la Nación.

Director/a: Gugliotta, Agustina.

METODOLOGÍA

1- Diseño y construcción del vector plasmídico pHS detector.

A partir del vector pLV Tag GFP, se amplificó la secuencia de interés evitando las regiones LTR, características del sistema lentiviral. La misma fue clonada en un vector comercial pGEM®-T Easy (Promega). Seguidamente se llevó a cabo la digestión del plásmido obtenido con las enzimas de restricción Clal y SmaI. Por último, se procedió a la ligación en el vector pBKS SV40 puromicina, digerido con las mismas enzimas de restricción. Luego de la transformación las colonias obtenidas fueron analizadas mediante colony PCR y digestión. La secuencia fue confirmada mediante secuenciación. En la figura 1 se muestra un esquema de la secuencia amplificada y clonada.



Figura 1: Representación esquemática del cassette de tagging. FRT: sitio de reconocimiento para la recombinasa FLp. CMV: promotor de citomegalovirus. GFP: proteína verde fluorescente. ΔNEO: resistencia a neomicina, carente de ATG. WPRE: Elemento regulatorio postranscripcional derivado del virus de la hepatitis de Woodchuck.

2- Evaluación de diferentes agentes de transfección.

Se realizó la transfección transitoria de células CHO-K1 cultivadas en condiciones de adherencia, empleando el vector pLV GFP. Se evaluaron diferentes agentes químicos de transfección: *Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)*, Polietilenimina (PEI) y *FreeStyle™ MAX Reagent (Invitrogen)*. Para el ensayo realizado se emplearon aproximadamente 400.000 cel/ml (en un volumen final de 1ml) y 1 µg de ADN. Para se respetó la relación 1 µl lípido catiónico/1 µg de ADN y 0,8 µg PEI/ 1 µg ADN. Luego de 48h las células fueron analizadas mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia.

3- Generación de líneas celulares empleando el vector pHS detector.

Para la generación de líneas celulares, se realizó la transfección de células CHO-K1 en condiciones de adherencia, empleando el vector plasmídico descrito anteriormente. Se respetaron las condiciones del ensayo establecidas anteriormente, utilizando *diferentes cantidades de ADN para la transfección: 2 µg, 1 µg y 0,5 µg. Luego de 48h las células fueron analizadas* mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia. Posteriormente, se comenzó con la etapa de selección, empleando concentraciones crecientes de puromicina al medio.

RESULTADOS

La secuencia del vector pHS detector, diseñado y construido en el presente trabajo, fue confirmada mediante secuenciación, para lo cual fue necesario diseñar 12 primers, obteniéndose así 12 secuencias que fueron alineadas con el vector teórico. El resultado de la secuenciación demostró un elevado porcentaje de coincidencia entre la secuencia obtenida y el mapa teórico.

Diferentes agentes de transfección fueron evaluados con el objetivo de seleccionar el más apropiado para la generación de las líneas celulares. El análisis mediante citometría de flujo reveló que *FreeStyle™ MAX Reagent (Invitrogen)* permitió obtener la mayor eficiencia de transfección, lográndose un 33,9% de células GFP positivas, de las cuales 1,68% presentaron elevados niveles de expresión, superiores a 10³ Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (UAF). *La eficiencia de transfección obtenida para la lipofectamina y PEI fue 8,5% y 0,5%, respectivamente.*

Las líneas celulares fueron generadas mediante transfección con el vector HS Detector empleando diferentes concentraciones de ADN: 2, 1 y 0,5 µg. El resultado de la transfección transitoria fue analizado mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia.

En la figura 2 se observa que, al incrementar la cantidad de ADN empleado para la transfección, aumenta el porcentaje de células verdes. El análisis por citometría de flujo

evidenció 36,72%, 11,72% y 2,85% de células GFP positivas para las poblaciones transfectadas con 2, 1 y 0,5 µg de ADN, respectivamente.



Figura 2: Microscopía de fluorescencia. **(A)** Células transfectadas con 0,5 µg de ADN **(B)** Células transfectadas con 1 µg de ADN **(C)** Células transfectadas con 2 µg de ADN. Todas las imágenes fueron adquiridas utilizando el mismo tiempo de exposición. Aumento: 100X.

Con el objetivo de generar líneas celulares estables, las células provenientes del ensayo de transfección transitoria fueron sometidas a la acción del agente de selección. Se emplearon concentraciones crecientes de puromicina: 5,10, 20, 50, 80 y 100 µg/ml. Inicialmente se observó la muerte masiva de los cultivos al emplear la menor concentración de puromicina, quedando sólo unas pocas células viables. Una vez que se observó la recuperación del cultivo celular se continuó con las diferentes etapas de selección. El análisis de la expresión de GFP de las líneas celulares obtenidas durante este proceso demuestra un aumento en la intensidad de expresión de GFP a medida que se incrementó la concentración puromicina, siendo la línea celular transfectada con 2 µg la que evidenció una mayor proporción de células con intensidades de GFP superiores a 10^3 Unidades Arbitrarias de Fluorescencia.



Figura 3: Resultados de la citometría de flujo de las células transfectadas con concentraciones crecientes de puromicina. **(A)** 0,5 µg de ADN **(B)** 1µg de ADN **(C)** 2 µg de ADN.

CONCLUSIONES

Se diseñó y construyó un vector que fue confirmado mediante secuenciación, además de ser funcional ya que se observó tanto expresión de GFP como resistencia a puromicina. Se lograron generar líneas celulares recombinantes productoras de la proteína reportera. El uso de puromicina como agente de selección, permitió enriquecer la población de interés.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Lai, T., Yang, Y., & Ng, S., 2013. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals*, 6(5), 579-603.
- Lawson, A. B., 2010. Hotspot detection and clustering: ways and means. *Environmental and Ecological Statistics*, 17(2), 231-245.

Kaestner, L., Scholz, A., & Lipp, P., 2015. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25(6), 1171-1176.

Kim, T. K., y Eberwine, J. H., 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8), 3173-3178.