

EVALUACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN MOLECULAR pcDNA3+/IFN- γ EN CÉLULAS HEK293, COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN ESTABLE PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOFÁRMACOS.

Yoanna García López, Carlos Alberto Távira Montalván, Mirna Rodríguez Aguilar, Uriel Abdallah Sánchez Pacheco, Abril Martínez Rizo, Angélica Meneses Acosta. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Farmacia, Cuernavaca, C.P. 62210. Correo electrónico: angelica_meneses@uaem.mx.

Palabras clave: Expresión estable, Interferón gamma, HEK293.

Introducción. El interferón gamma (tipo II) es una citocina pleiotrópica que regula diversas funciones biológicas como antivirales, antiproliferativas, antitumorales, inmunomoduladoras, etc. (1). El IFN- γ recombinante se ha expresado en levaduras, baculovirus, vectores virales; pero principalmente en sistemas bacterianos presentando diversas desventajas (monómero y falta de glicosilación), siendo necesario buscar nuevas alternativas para la expresión con mejor calidad y potencial terapéutico (2). Así, el uso de líneas celulares de mamífero con expresión estable representa una herramienta atractiva para la sobreexpresión de proteína recombinante con calidad adecuada dada sus características para generar modificaciones postraduccionales complejas, plegamiento correcto de la proteína y capaz de secretar el producto al medio de cultivo para su posterior purificación (3). Así, el objetivo de este trabajo es generar una línea celular HEK293 que exprese establemente el homodímero glicosilado de interferón gamma.

Metodología. Se realizó la construcción del vector plasmídico pcDNA3+ con el inserto de IFN- γ proveniente del vector pVax/IFN- γ . Posteriormente se transformaron bacterias *E. coli DH5- α* para su amplificación, y se purificó y secuenció. Por otra parte, se realizó el cultivo de células HEK293 adherentes en placas de 6 pozos en medio DMEM/F-12 al 10% de SFB y se transfectaron con el vector recombinante (pcDNA3+/IFN- γ) a través del método de Lipofectamina™ 2000 (4, 5). Los cultivos transfectados fueron monitoreados y mantenidos para realizar la selección de clones positivos y su amplificación a través del gen de resistencia a Neomicina monitoreando así la viabilidad celular por la técnica de exclusión de azul de tripano. Finalmente, la expresión proteica del IFN- γ se detectó mediante RT-PCR y Western Blot; y, se cuantificó por la técnica de ELISA.

Resultados. Se comprobó que la construcción molecular pcDNA3+/IFN- γ se llevó a cabo correctamente ya que la reacción de ligación del pcDNA3+ + IFN- γ con la ayuda de la enzima ADN ligasa T4 arrojó un producto final alrededor de los 5900 pb. Posteriormente, mediante el método de transformación en bacterias *E. coli DH5- α* se verificó la construcción deseada al observarse colonias positivas en el agar LB con resistencia a ampicilina 100 μ g/mL. Así

mismo, mediante PCR y secuenciación, se comprobó que dicha construcción molecular contiene la secuencia que codifica para el gen de IFN- γ amplificando el fragmento alrededor de los 520 pb (Fig. 1). Finalmente, los cultivos HEK293 transfectados se mantienen en medio de selección DMEM/F-12 al 10% de SFB con antibiótico GENETICIN® a 200 y 300 μ g/mL para realizar la selección clonal y se evaluó la expresión de la proteína de interés por WB.

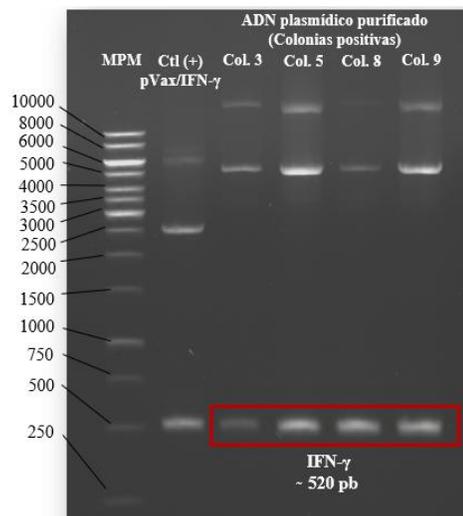


Fig. 1. PCR de colonias positivas con el constructo pcDNA3+/IFN- γ . Amplificación del gen de interés a 520 pb.

Conclusiones. El vector plasmídico recombinante contiene la secuencia que codifica para el gen de IFN- γ amplificando el fragmento a las 520 pb. Por lo tanto, se espera que el vector pcDNA3+/IFN- γ sea capaz de entregar el gen de interés a las células blanco (HEK293) al observar mediante una expresión estable el homodímero de interferón gamma.

Agradecimientos. Este trabajo es apoyado por la beca de posgrado Conacyt con No. de becario: 894349.

Bibliografía.

- Smith, N. L. D., & Denning, D. W. (2014). Immunology. 143: 499–511.
- García, J. et al. (2013). VacciMonitor, 22(2): 30–39.
- Amaza, B. (2008). Guideline for Generation of Stable Cell Lines. 1–12.
- Invitrogen (2005). Lipofectamina™ 2000. 1-4.
- Invitrogen (2010). Manual pcDNA™3.1(+), pcDNA™3.1(-). 1-23.