



EFECTO DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE LA HEMOGLOBINA DE *Vitreoscilla* EN EL METABOLISMO AEROBIO Y PRODUCCIÓN DE GFP EN CÉLULAS CHO

Mariana Juárez¹, Claudia H. González², Juan Carlos Sigala¹, Alvaro R. Lara¹

Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa Departamento de ¹Procesos y Tecnología y ²Ciencias Naturales
alara@correo.cua.uam.mx

Palabras clave: Células CHO, GFP, Hemoglobina de *Vitreoscilla*

Introducción. El diseño de fábricas celulares robustas es una necesidad creciente en la bioindustrial. Las células de ovario de hámster chino (CHO) se han consolidado como la plataforma más usada para la producción de glicoproteínas. Sin embargo, es necesario proveer alternativas para mejorar en desempeño metabólico de las células CHO con miras a aplicaciones de bioproceso. Por ejemplo, nuestro grupo ha demostrado que la expresión transitoria de la hemoglobina de *Vitreoscilla* (VHb) es una manera sencilla de reducir la producción de lactato e cultivos de células CHO. En el presente estudio, reportamos el efecto de la expresión constitutiva de la VHb en la expresión de proteína verde fluorescente y la concentración intracelular de cofactores y ATP.

Metodología. Se desarrolló y semipurificó una población policlonal de células CHO-K1 expresando el gene de la VHb (*vgb*) optimizado empleando Lipofectamine LTX y el reactivo Plus (ThermoFisher). La expresión de *vgb* fue comprobada por Western Blot. Se realizaron cultivos estáticos en medio ATCC suplementado con suero fetal bovino. Se midió la fluorescencia de GFP y viabilidad celular mediante citometría de flujo (FACS Calibur, BD). Las células se transfectaron con un plásmido vacío (pVAX1) o conteniendo el gene *vgb*. Se midieron las concentraciones intracelulares de ATP y la proporción de NAD⁺/NADH y NADP⁺/NADPH mediante kits enzimáticos (Sigma, USA) y medición de fluorescencia en un lector de placas (Tecan Infinite M1000 PRO (Mänendorf, Suiza).

Results. En la Fig. 1 se observa que la expresión de la VHb incrementó ligeramente la cantidad de células con fluorescencia de GFP, así como la intensidad de fluorescencia. La viabilidad no fue impactada por la expresión de VHb, y la fluorescencia media de GFP incrementó por acción de la VHb. La VHb provocó cambios en la relación de NADP⁺/NADPH y la cantidad de ATP intracelular, lo que sugiere un estado metabólico más oxidativo y consumidor de energía.

Conclusions. La expresión de la VHb insertada en el cromosoma contribuyó a una mejora de la expresión de GFP en células CHO. También se detectaron cambios en el metabolismo energético. Esta estrategia tiene amplio potencial para mejorar el desempeño industrial de las células CHO.

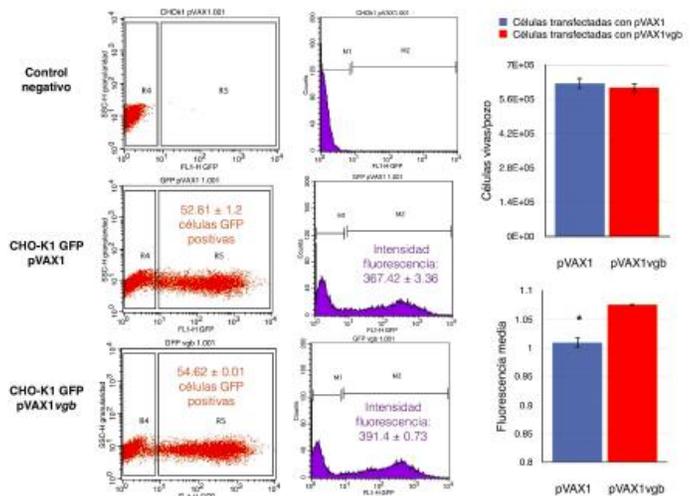


Figure 2. Figura 9.1. Porcentaje de células GFP positivas, intensidad de fluorescencia (U.A.) y número de células viables en las células CHO-K1 gfp policlonales sin purificar. Las células fueron transfectadas con Lipofectamine 2000, pVAX1 y pVAX1-vgb y el análisis se hizo a las 24 h post-transfección. Los datos son presentados como el promedio ± el error estándar ($n = 2$). Se evaluó * $p < 0.05$.

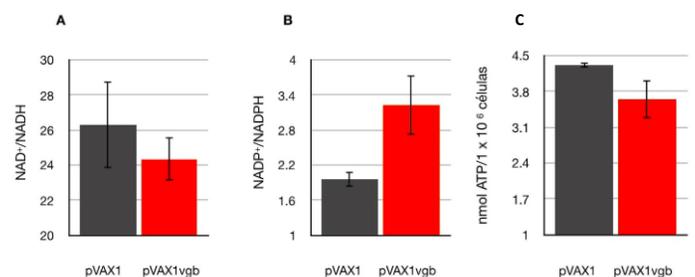


Figura 2. Relación NAD⁺/NADH (A), NADP⁺/NADPH (B) y ATP (C) para las células CHO-K1 gfp policlonales 36 h post-transfección con pVAX1 y pVAX1-vgb. Los datos son presentados como el promedio ± el error estándar ($n = 2$).

Acknowledgements. CONACyT grant 256617

Bibliography.

1. Juárez M, González-De la Rosa, CH, Memún E, Sigala JC, Lara A. R. 2017. Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the growth performance of CHO-K1 cells. *Biotechnology Journal*. 12: 1-6

