



GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES PRODUCTORAS DE INTERFERÓN GAMMA POR MÉTODO DE SELECCIÓN CLONAL UTILIZANDO CHO-S/ pcDNA3/IFN- γ COMO SISTEMA DE INTEGRACIÓN ALEATORIA

Mirna Rodríguez-Aguilar^L, Yoanna García-López^L, Carlos A. Tavira-Montalván^M, Angélica Meneses-Acosta^D
angelica_meneses@uaem.mx

Facultad de farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad No. 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62209

Palabras clave: glicoproteínas, expresión estable, modificaciones postraduccionales.

Introducción. Durante la producción de glicoproteínas como el interferón gamma (IFN- γ) humano la elección del sistema de expresión es crucial, ya que éste tiene gran influencia en la calidad y cantidad de la proteína recombinante producida [1]. Las células de mamífero son los hospederos de elección para la producción de estas proteínas, debido a que generan modificaciones postraduccionales complejas, plegamiento correcto de la proteína y son capaces de secretar el producto al medio de cultivo [2] [3]. El éxito generalizado de la línea celular CHO se debe a su inigualable adaptabilidad, usándose generalmente en la expresión estable o constitutiva de glicoproteínas, ya que estos sistemas permiten caracterizar la función y estructura de las proteínas recombinantes complejas [4].

Así, el objetivo de este trabajo es generar una línea celular CHO-S productora estable de la proteína interferón gamma, mediante la técnica de lipofección utilizando el plásmido pcDNA3/IFN- γ y caracterizar la producción de la proteína.

Metodología. Se realizó la construcción molecular del plásmido pcDNA3/IFN- γ insertando el gen de IFN- γ obtenido a partir de pVAX1/IFN- γ utilizando enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI*. Dicho plásmido se clonó en bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes; se purificó mediante Maxiprep y se caracterizó mediante PCR, análisis de restricción y secuenciación de gen. Paralelamente, se caracterizó la línea CHO-S sin transfectar mediante cinéticas de crecimiento y análisis de metabolitos. Esta línea celular se transfectó utilizando Lipofectamina 2000 [5] según indica el protocolo con el plásmido pcDNA3/IFN- γ linealizado con la enzima MunI y se realizó la selección clonal iniciando 48 hrs post transfección con el antibiótico G418 a una concentración de 400 μ g/mL promoviendo la inserción del plásmido aleatoriamente al genoma celular. Posterior a dos meses de selección clonal se realizó la cuantificación de la proteína mediante la técnica de ELISA.

Resultados. Se obtuvo la construcción molecular del plásmido de expresión pcDNA3/IFN- γ . Posteriormente, para la caracterización del mismo por medio de PCR se obtuvo un fragmento de 520 pb correspondiente al transgén de IFN- γ y en el análisis de restricción se obtuvo una banda de aproximadamente 5920 pb indicando el tamaño completo de la construcción y en el análisis de secuenciación indicó que la secuencia corresponde al transgén de IFN- γ humano.

Asimismo, se realizó la caracterización de la línea celular CHO-S. Posteriormente se realizó la transfección y la selección clonal usando el antibiótico G418 como marcador de selección (Figura 1). El tratamiento con antibiótico continuado de las células a largo plazo presiona a las células a integrar con éxito el plásmido en el genoma celular, el cual se transmitirá a las generaciones futuras de la célula en la expansión de sólo las células transfectadas de forma estable, mientras que las células no estables morirán

debido a la falta de resistencia a los antibióticos. Dos meses después de la primera selección clonal se realizó la cuantificación de la proteína IFN- γ ELISA, obteniendo una cantidad de 27 μ g/mL.

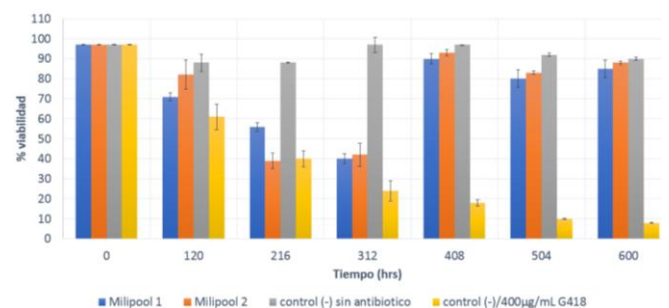


Fig. 1. Porcentaje de viabilidad de las células CHO-S transfectadas con el plásmido pcDNA3/IFN- γ mediante lipofección durante la selección. Medio de selección utilizado: Excell Advanced CHO medio, 8mM Glutamina, 400 μ g/mL de antibiótico G418. Placas de 6 pozos, manteniéndose a 37°C, 5% CO₂, 40 rpm. Densidad celular inicial de 500,000 cel/mL, con seis pases.

Conclusiones. La construcción molecular del vector de expresión pcDNA3/IFN- γ , se transfectó satisfactoriamente en la línea celular CHO-S induciendo así posteriormente a la integración del plásmido al genoma celular mediante el uso de G418. Se continúa realizando la selección clonal para asegurar una línea estable productora de IFN- γ , obteniendo una cantidad mayor de proteína producida a la que tiene actualmente.

Agradecimientos. Se agradece el apoyo financiero otorgado por CONACyT CB-2015, 257408; y al apoyo CONACyT INFR-2014, por medio del proyecto 226271. Asimismo, se agradece al CONACyT por el otorgamiento de la beca 892658.

Bibliografía.

- [1] A. D. Bandaranayake and S. C. Almo, "Recent advances in mammalian protein production," *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 2, pp. 253–260, 2014.
- [2] D. L. Hacker and S. Balasubramanian, "Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 38, pp. 129–136, 2016.
- [3] J. Zhu, "Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 5, pp. 1158–1170, 2012.
- [4] J. Y. Kim, Y. G. Kim, and G. M. Lee, "CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 3, pp. 917–930, 2012.
- [5] INVITROGEN, "Lipofectamine™ 2000 protocol," vol. Cat. No. 1, no. 11668, pp. 2–5, 2005.

