

Edición genética de células CHO productoras estables de una proteína recombinante utilizando la herramienta CRISPR/Cas9

Daniel Barreto, Octavio Tonatiuh Ramírez, Laura Alicia Palomares, Mabel Rodríguez
Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Mor. CP 62210.
Correo electrónico: danielbc@ibt.unam.mx, laura@ibt.unam.mx, mabel@ibt.unam.mx

Palabras clave: Mutagénesis dirigida, CRISPR/Cas, células CHO

Introducción. Las células CHO (provenientes del ovario de hámster chino) son las más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes para uso terapéutico, por su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales similares a las del humano, así como por su alta productividad (1). Para establecer una clona celular productora estable es necesario realizar una selección y caracterización. Durante este proceso es posible identificar la presencia de mutaciones en el transgén, causadas por la presión de selección y amplificación del gen a la que se someten las células (2). Una estrategia para corregir mutaciones en el genoma de líneas celulares es el uso de la tecnología CRISPR/Cas9, herramienta que permite realizar cortes de doble cadena en el genoma utilizando nucleasas programables. Esta estrategia aprovecha los mecanismos de reparación del ADN, siendo de especial interés la reparación dirigida por recombinación homóloga (3). El uso de oligonucleótidos como molde de reparación para realizar modificaciones en el genoma se ha utilizado recientemente con éxito, obteniendo eficiencias mayores al 40% en líneas celulares de mamífero (4).

En este proyecto se realizó la edición de un transgén en células CHO productoras de una proteína recombinante, utilizando la herramienta CRISPR/Cas9.

Metodología. Se eligió un ARN guía para Cas9, el cual fue amplificado y clonado en el vector pspCas9 BB-2A PX458 9, que expresa Cas9 y la proteína EGFP. Este vector fue transfectado en células CHO, junto a un oligonucleótido para realizar recombinación homóloga. Posteriormente, se realizó la selección de las células que expresan EGFP utilizando fluorescence-activated cell sorting (FACS). Se extrajo ADN genómico de las clonas obtenidas y se amplificó una región del gen mediante PCR. La edición genética se corroboró mediante ensayos de restricción.

Resultados. Se construyó la secuencia guía mediante PCR y ésta fue clonada en el vector pspCas9 BB-2A PX458 9, el cual tiene un tamaño de 9245 pb (**Fig.1**). Se realizó la transfección de las células CHO con la mezcla del vector y el oligonucleótido, seleccionando clonas fluorescentes por la expresión de EGFP. A partir de estas células se amplificó el transgén por PCR y se seleccionó

una clona que contiene la secuencia deseada por ensayo de restricción, la cual posteriormente fue secuenciada.

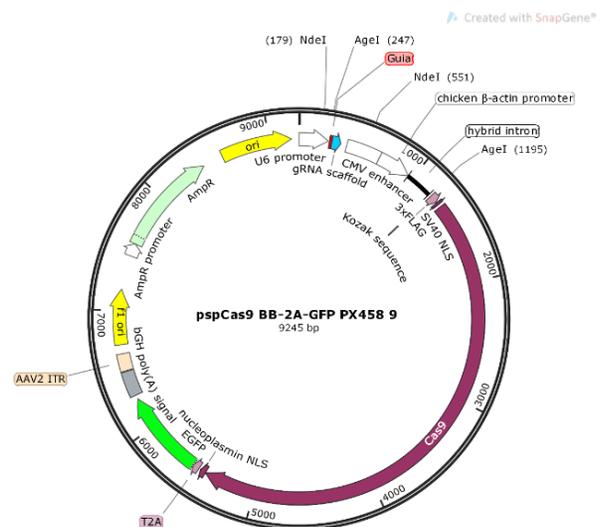


Fig. 1. Diseño *In silico* del producto de la clonación del ARN guía en el vector (Vector pspCas9 BB-2A PX458 9).

Conclusiones. La herramienta CRISPR/Cas9, dirigida por un ARN guía permitió modificar la secuencia del transgén de interés mediante recombinación homóloga, usando como molde de recombinación un oligonucleótido.

Agradecimientos. Por el apoyo técnico M.C. Ana Ruth Pastor, M. C. Martha Alicia Contreras, M. C. Vanessa Hernández y M. C. Edgar Alfonso Gómez. Financiamiento CONACyT CB 255445. Agradecemos a Laboratorios Liomont por el apoyo para la realización de este proyecto.

Bibliografía.

1. Kim J Y, Kim Y-G & Lee G M. (2012) *Appl Microbiol Biotechnol* 93(3), 917–930
2. Wurm F (2013). *Processes*. 1(3), 296–311.
3. Sander J D & Joung J K (2014) *Nat Biotechnol*. 32(4), 347-355
4. Liang X, Potter J, Kumar S, Ravinder N & Chesnut, J. D. (2017). *J Biotechnol*. 242, 136-146