

SOBREEXPRESION DEL TRANSPORTADOR MITOCONDRIAL DE PIRUVATO EN CÉLULAS CHO INCREMENTA LA PRODUCTIVIDAD DE PROTEÍNA RECOMBINANTE Y REDUCE LA PRODUCCION DE LACTATO

Dubhe Beatriz Bulté Ocaña, Carolina Gómez, Alberto Porras, Laura A. Palomares y Octavio Tonatíuh Ramírez
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ave Universidad 2001. Col, Chamilpa. CP 62210. Cuernavaca, Morelos.

dubhe@ibt.unam.mx, tonatíuh@ibt.unam.mx

Palabras clave: transportador mitocondrial de piruvato, proteínas recombinantes en células CHO, ingeniería metabólica

Introducción. Las células CHO son el sistema de elección para la producción de proteínas recombinantes con adecuado plegamiento y glicosilación. Sin embargo, su principal limitación radica en un metabolismo caracterizado por alta tasa de glicólisis en presencia de oxígeno, que resulta en elevada producción de lactato (1). Diversos estudios han proporcionado evidencia sobre el cuello de botella en el importe de piruvato a las mitocondrias y el papel del transportador mitocondrial de piruvato (MPC) en esta función. El MPC es un complejo multimérico con dos tipos de subunidades en células de mamíferos (MPC1 y MPC2) (2,3). El objetivo de este trabajo ha sido demostrar que la sobreexpresión del MPC en células CHO favorece la entrada de piruvato a la mitocondria, promoviendo un incremento del metabolismo oxidativo que redunde en la optimización de la eficiencia metabólica reduciendo la producción de lactato e incrementando la productividad de proteínas recombinantes.

Metodología.

Se generaron dos líneas celulares estables CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1 a partir de la transfección de células CHO-S con construcciones obtenidas del plásmido pCHO 1.0 (*Invitrogen*), el cual posee dos sitios de recombinación con diferentes promotores, donde fueron clonadas las secuencias codificantes *mpc1* y *mpc2* en diferente orden. Se corroboró la sobreexpresión de MPC a nivel de transcrito mediante RTqPCR analizando la expresión relativa de los genes recombinantes (*Mus musculus*) con relación a las secuencias nativas (*Cricetulus griseus*). También se evaluó a nivel de proteína mediante Western Blot y se comprobó la localización mitocondrial de las subunidades recombinantes mediante Inmunofluorescencia.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión del transportador sobre el desempeño metabólico, se desarrollaron transfecciones transitorias en las líneas celulares CHOmpc1mpc2, CHOmpc2mpc1 y CHO-EGFP como control, con un vector pVAX1-SEAP conteniendo la secuencia de la enzima Fosfatasa Alcalina Placentaria humana en su forma secretada (hSEAP) y pCHO-EDE1 para la expresión del anticuerpo monoclonal EDE1-C8, como proteínas modelo. Seguidamente, se realizaron cinéticas de crecimiento de los cultivos transfectados.

Resultados. Se constató que ambas subunidades del MPC se están sobreexpresando en las líneas celulares CHOmpc1mpc2 y CHOmpc2mpc1 a nivel de transcrito y de proteína, así como la localización mitocondrial del complejo. La evaluación cinética de las células CHO-mpc mostró una reducción del 45% de la concentración de lactato con respecto al control. La tasa de crecimiento celular y la concentración máxima también aumentaron, y se observaron incrementos de alrededor de un 40% en la producción de proteínas recombinantes.

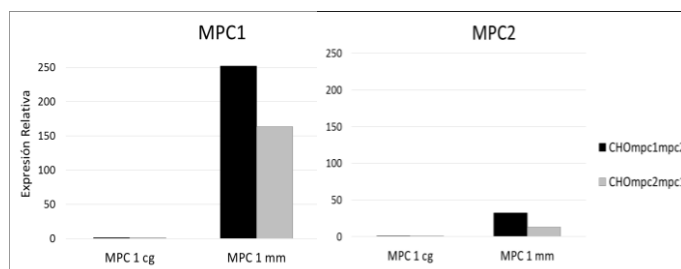


Fig. 1. Expresión relativa de *mpc1* y *mpc2* mediante qRT-PCR.

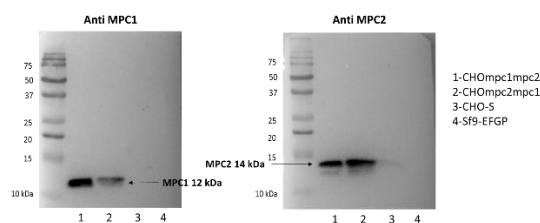


Fig. 2. Inmunodetección de las proteínas MPC1 y MPC2.

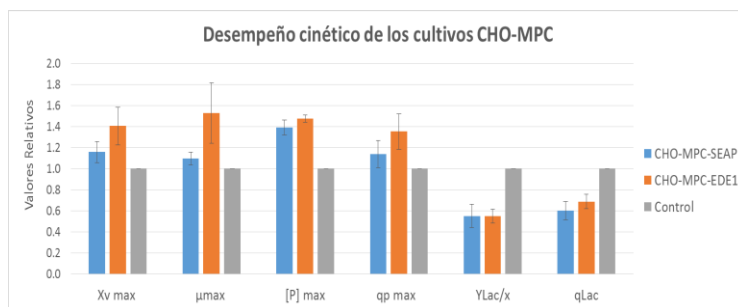


Fig. 3. Comportamiento relativo de los principales parámetros cinéticos en la línea celular CHOmpc1mpc2, produciendo hSEAP o EDE1-C8.

Conclusiones. Se mostró que el transporte de piruvato a las mitocondrias limita la eficiencia de la oxidación de la glucosa, lo cual puede ser optimizado mediante el presente enfoque de Ingeniería Metabólica.

Agradecimientos. UNAM-DGAPA-PAPIIT IT-200315 y SEP-CONACyT Ciencia Básica 255445.

Bibliografía.

(1) Altamirano C, Berrios J, Vergara M, Becerra S (2013). *E J Biotechnol* 16 (3) 1-14. (2) Bricker DK, et. al. (2012). *Science* 337(6090): 96-100. (3) Herzig S, et. al. (2012) *Science* 337: 93-96.

