

## FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE CÉLULAS CHO RECOMBINANTES

Saumel Pérez-Rodríguez<sup>1</sup>, Octavio T. Ramírez<sup>2</sup>, Mauricio, A. Trujillo-Roldán<sup>1</sup>, Norma A. Valdez-Cruz<sup>1\*</sup>

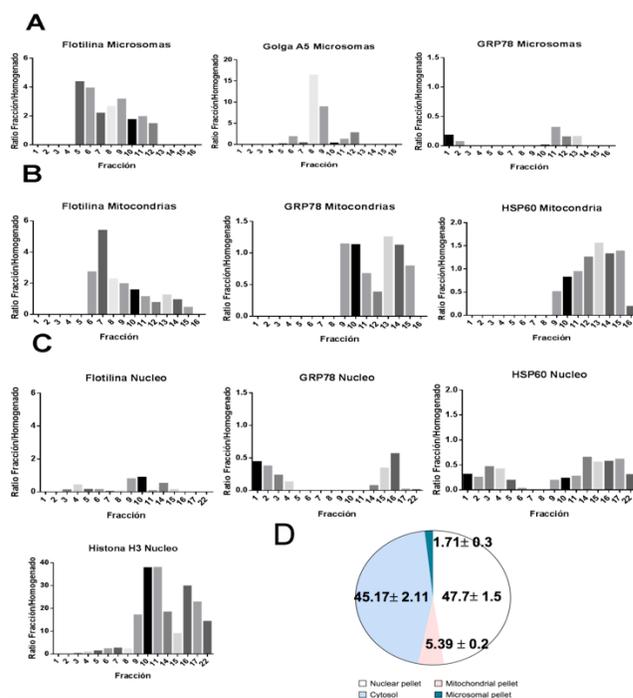
<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX C.P. 04510; <sup>2</sup>Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., México. [adrivaldez1@gmail.com](mailto:adrivaldez1@gmail.com)

*Palabras clave: Fraccionamiento subcelular, células CHO, proteínas recombinantes.*

**Introducción.** Se han publicado varios protocolos para el fraccionamiento subcelular. Las técnicas de centrifugación diferencial e isopícnica se emplean comúnmente (1). Sin embargo, el análisis cuantitativo de compartimentos de células de ovario de hámster chino (CHO) es escaso. Alrededor del 70% de proteínas recombinantes (PR) terapéuticas que requieren modificaciones postraduccionales similares a las que se encuentran en humanos, se producen preferentemente en células CHO. Al ser el sistema de expresión heterólogo preferido para producir glicoproteínas recombinantes, el estudio profundo de la biología celular y la proteómica para lograr que sean más productivas se ha incentivado (2). El objetivo de nuestro estudio fue establecer un protocolo cuantitativo y reproducible para obtener fracciones enriquecidas de orgánulos subcelulares pobremente representados y por lo tanto poco estudiados en análisis proteómicos de células completas.

**Metodología.** La línea celular CHO CRL-12444 productora de un anticuerpo monoclonal fue crecida en Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio a 60 rpm, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, en medio CDM4CHO suplementado con insulina, glutamina y MTX. Las muestras se colectaron a las 72 h de cultivo. Las muestras celulares se sometieron a una ruptura mecánica en homogenizador Dounce y la combinación de la centrifugación diferencial e isopícnica (1). La caracterización de los gradientes de sacarosa se realizó mediante observación visual, y cuantificación de proteínas totales. Los marcadores subcelulares (histona H3, GAPDH, GRP78, HSP60 y flotilina) fueron seguidos por Western blot (cuantificados por densitometría), ELISA y reacciones enzimáticas (catalasa y DNasa). Las subfracciones fueron visualizadas por microscopía electrónica. Los precipitados (nuclear, mitocondrial y microsomal) fueron separados en un gradiente discontinuo de sacarosa de entre 10-60%.

**Resultados.** La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de CHO CRL-12444 fue de  $0.034 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ . Después de la ruptura celular se realizó una serie de centrifugaciones diferenciales obteniéndose los siguientes compartimentos: 1) Núcleo asociado a Retículo endoplásmico (RE), membrana plasmática y mitocondrias, 2) Mitocondria asociada a RE, Golgi, y membrana plasmática, y 3) ER, Golgi y membrana plasmática. En general, la mayoría de las proteínas observadas pertenecen al citosol y al núcleo. Después del fraccionamiento por centrifugación isopícnica, se observó la separación de una fracción compuesta por núcleo, mitocondria, RE, peroxisomas, y lisosomas a partir del gradiente nuclear. A partir de la fracción de mitocondria se separó una fracción de Cis Golgi y otra de Cis Golgi, mitocondria y RE. Mientras, que en la fracción microsomal se obtuvieron proteínas de RE, Cis Golgi, y Trans Golgi (Fig.1A,1B,1C) logrando el enriquecimiento de esta fracción que solo representa 1.7% del fraccionamiento diferencial (Fig. 1D).



**Fig. 1.** Cuantificación de marcadores en WB a partir de gradientes de sacarosa de los precipitados del fraccionamiento diferencial (FD). Marcadores: Histona H3, G3PDH, GRP78, flotilina-1, Golga A5 y HSP60, que marcan el núcleo, citosol, RE, membrana plasmática, cis Golgi y mitocondria, respectivamente. **A:** Gradiente microsomal, **B:** Mitocondrial, **C:** Nuclear. **D:** Distribución de proteínas del FD.

**Conclusiones.** La mayoría de las proteínas se distribuyeron entre el citosol y la fracción nuclear. La fracción nuclear fue la mejor separada, mientras que las mitocondrias se encontraban entre los sedimentos nucleares y los mitocondriales. Las membranas plasmáticas se encontraron en casi todas las fracciones. Importantly, la fracción microsomal que contiene el aparato de Golgi y RE fue separada y enriquecida. El protocolo obtenido fue realizado por duplicado fue reproducible, por lo que podría ser usado en análisis proteómicos.

**Agradecimientos.** Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IT-200719, IN-208414) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT 247473, 220795).

### Bibliografía.

- Zhang J, et al., (1998) *J. Biol. Chem.* 273(20):12436-12442.
- Kuo et al., (2018) *Current Opinion in Biotech.* 51:64-69.