

TOSSOLINI, Ileana<sup>a,b</sup>; GUGLIOTTA Agustina<sup>a,b</sup>; LOPEZ DÍAZ, Fernando<sup>d</sup>; KRATJE, Ricardo<sup>ab</sup>; PRIETO, Claudio<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Cultivos Celulares, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. <sup>b</sup> CONICET, Santa Fe, Argentina.

<sup>c</sup> Cellargen Biotech S.R.L., Santa Fe, Argentina. <sup>d</sup> Regulatory Biology Laboratory, Salk Institute for Biological Studies, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037.

## INTRODUCCIÓN

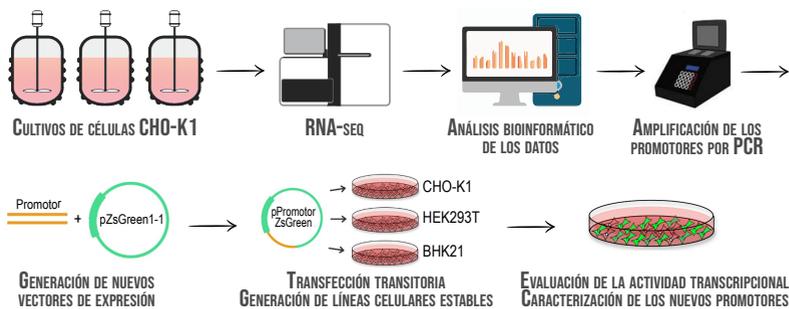
Las células CHO (*chinese hamster ovary*) constituyen el sistema huésped de elección para la producción industrial de proteínas recombinantes terapéuticas. Este proceso requiere de la optimización de diversos parámetros, entre ellos, el diseño del vector de expresión. Actualmente, los promotores virales (como CMV) son los más empleados ya que brindan niveles altos de expresión de la proteína recombinante de interés.

Sin embargo, estos promotores muchas veces se encuentran sujetos a silenciamiento epigenético, y suelen imponer a las células cierto estrés, pudiendo interrumpir su crecimiento y afectar diversos procesos celulares. Idealmente, la función promotora debe coordinarse con el proceso productivo. Por estas razones, el uso de promotores endógenos que respondan a la dinámica de un bioproceso, constituye una alternativa interesante y prometedora.

## OBJETIVOS

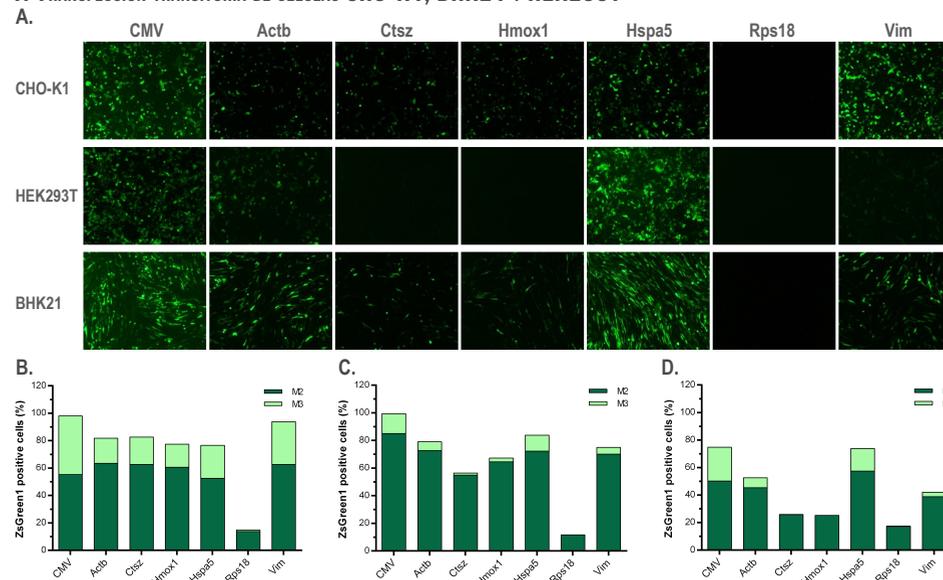
- Identificar, mediante RNA-seq de células CHO-K1, promotores de genes con elevada expresión durante un proceso típico de producción de proteínas recombinantes en biorreactor (modo perfusión y gradiente de temperatura).
- Construir con tales promotores, nuevos vectores de expresión para la proteína fluorescente ZsGreen1, y evaluar su actividad transcripcional mediante la transfección de células CHO-K1, BHK21 y HEK293T.
- Analizar su estabilidad de expresión en el tiempo, así como también la actividad transcripcional de los promotores a 32 y 37 °C.
- Realizar una caracterización *in silico* de las secuencias de los promotores endógenos.

## METODOLOGÍA



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS CHO-K1, BHK21 Y HEK293T



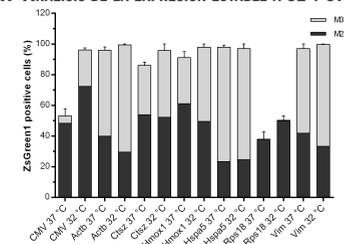
**Figura 1.** Análisis de la expresión transiente de ZsGreen1 bajo el control del promotor viral CMV (control) y los promotores endógenos Actb, Ctsz, Hmx1, Hspa5, Rps18 y Vim, en diferentes líneas celulares. **A.** Mediante microscopía de fluorescencia. **B, C, D.** Mediante citometría de flujo: se muestra el %ZsGreen1 para las células CHO-K1, BHK21 y HEK293T, respectivamente, co-transfectadas con los nuevos vectores y el plásmido pCneo-CMV-IFN $\alpha$ . **M2:** Células con intensidad de fluorescencia moderada ( $10^1$ - $10^3$  unidades arbitrarias de fluorescencia-UAF). **M3:** Células con elevada intensidad de fluorescencia ( $>10^3$  UAF).

### 3. CARACTERIZACIÓN IN SILICO DE LAS SECUENCIAS DE LOS PROMOTORES

**Tabla 1.** Predicción de elementos funcionales potenciales en las secuencias de los promotores.

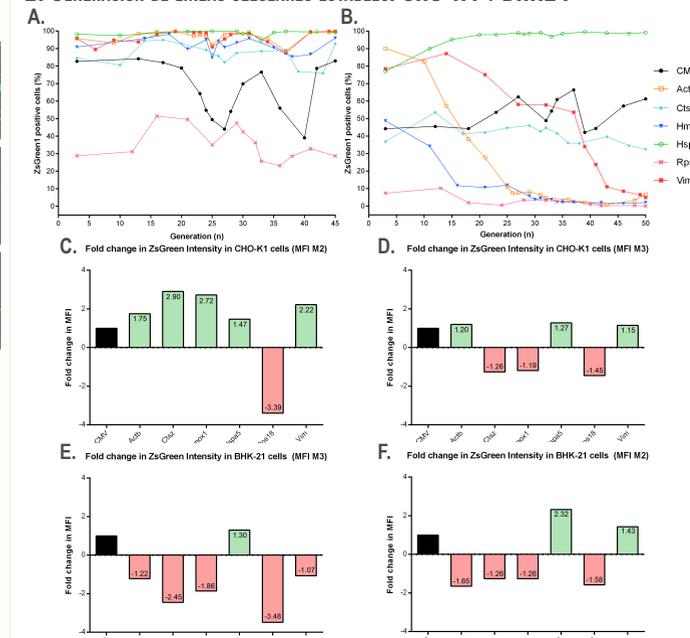
PROMOTOR	SIZE (BP)	TATA BOX	DISTANCE TATA TO TSS	%GC	CPG ISLANDS	SP1	GC-BOX	E-BOX	AP-1	TOTAL PUTATIVE TFBS
ACTB	999	Yes	11 bp	55	-	12x	2x	3x	-	31
CTS2	972	No	-	56	-	12x	3x	5x	-	34
HMOX1	900	No	-	51	-	5x	2x	6x	-	23
HSPA5	906	Yes	31 bp	60	1x	17x	8x	6x	1x	35
RPS18	1043	Yes	42 bp	49	-	5x	-	5x	2x	25
VIM	961	Yes	17 bp	58	-	24x	2x	-	4x	36
CMV	1101	Yes	374 bp	46	1x	9x	2x	5x	2x	59

### 4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN ESTABLE A 32 Y 37 °C



**Figura 3.** Evaluación de los niveles de expresión de ZsGreen1 en células CHO-K1 cultivadas de forma paralela a 32 °C y 37 °C, durante 10 días.

### 2. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES: CHO-K1 Y BHK21



**Figura 2.** Estabilidad de expresión de ZsGreen1 en células: **A.** CHO-K1 y **B.** BHK21 cultivadas hasta 45 y 50 generaciones, respectivamente, en ausencia de neomicina. **C-F.** Fold-change en la intensidad media de fluorescencia (MFI) en M2 y M3.

## CONCLUSIÓN

Se obtuvieron promotores endógenos de células CHO-K1 que constituyen una alternativa promisoriosa al uso de promotores virales, para la producción de proteínas recombinantes de interés bioterapéutico.

Los mismos responden a las condiciones de cultivo habitualmente implementadas en escala productiva (alta densidad en cultivos en modo perfusión y con un gradiente de temperatura).

Estos promotores conforman un panel inicial para diseñar estrategias de ingeniería celular y promotores sintéticos, así como para el desarrollo de líneas celulares industriales.