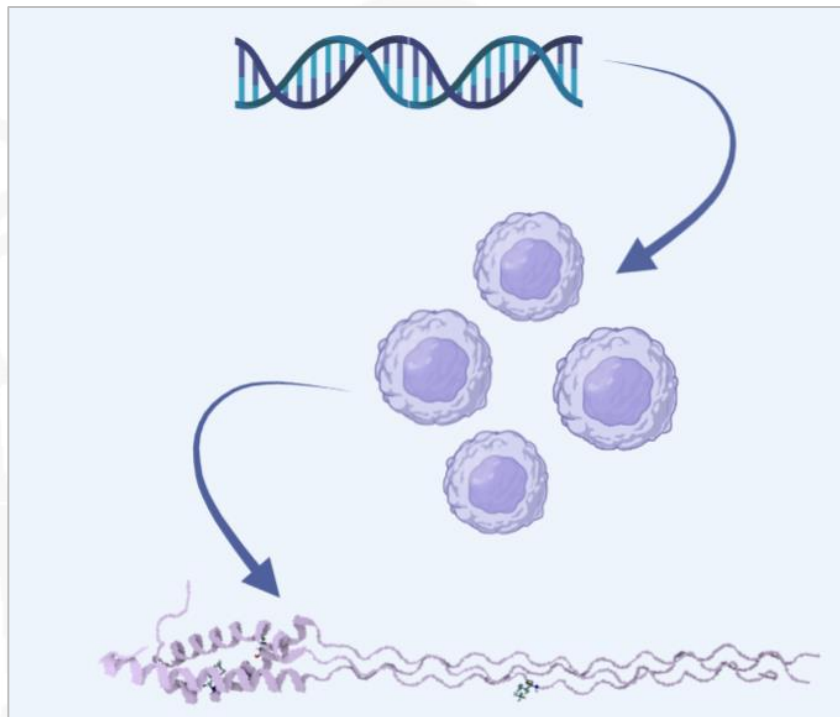


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

Producción recombinante del colágeno XI α 1 extracelular humano



María Berdasco Paredes

Biología funcional/Universidad de Oviedo

07/2023



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA





Resumen

La cadena $\alpha 1$ del colágeno XI está codificada en el gen COL11A1, la sobreexpresión de este gen está asociada con la aparición de diferentes carcinomas invasivos humanos. En este trabajo se persiguió la producción recombinante de procolágeno XI α 1 humano, mediante el uso de células CHO-S transformadas con el vector COL11A1 OHu25477D pcDNA3.1+/C-(K)-DYK. Para detectar la proteína se realizaron análisis mediante SDS-PAGE y western blot. A su vez, se procedió a la adaptación de células CHO DG44 al cultivo en suspensión en un medio químicamente definido sin suero. Tras varios intentos de transformación, no se consiguió la expresión recombinante fiable del procolágeno XI α 1 humano en células CHO-S.

Abstract

The collagen XI $\alpha 1$ chain is encoded in the COL11A1 gene, overexpression of this gene is associated with the occurrence of different human invasive carcinomas. In this work we pursued the recombinant production of human procollagen XI α 1 using CHO-S cells transformed with the COL11A1 OHu25477D pcDNA3.1+/C-(K)-DYK vector. For protein detection, SDS-PAGE and western blot analyses were performed. In turn, CHO DG44 cells were adapted to suspension culture in chemically defined medium without serum. After several transformation attempts, reliable recombinant expression of human procollagen XI α 1 in CHO-S cells was not achieved.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivo	3
3. Materiales y métodos.....	4
3.1. Obtención de vector con el gen de interés.....	4
3.2. Amplificación del vector	4
3.3. Extracción y purificación del ADN plasmídico.....	5
3.4. Linearización del plásmido y electroforesis en gel de agarosa	5
3.6. Cultivo de células CHO-S	6
3.7. Determinación de la mínima dosis letal de geneticina	6
3.8. Transfección de células CHO-S.....	7
3.9. Separación de las células y concentración del medio de cultivo tras transformación	7
3.10. SDS-PAGE.....	8
3.10.1. Tinción con azul de Coomassie	8
3.10.2. Western blot.....	8
3.11. Cultivo de células CHO DG44 <i>dhfr</i>	9
4. Resultados y discusión.....	10
4.1. Amplificación, purificación y linearización del plásmido	10
4.2. Mínima dosis letal de geneticina para las células CHO-S.....	13
4.3. Transfección con plásmido circular en células CHO-S.....	13
4.3.1. Viabilidad celular	14
4.3.2. Análisis mediante SDS-PAGE y western blot	15
4.4. Transfección con plásmido linearizado en células CHO-S.....	20
4.5. Adaptación de las células CHO DG44.....	20
5. Conclusiones	20
6. Bibliografía	21



Producción recombinante del colágeno XI α 1 extracelular humano

1. Introducción

El colágeno es una molécula proteica formada por tres cadenas polipeptídicas. Cada una de estas cadenas está formada por una hélice de poliprolina tipo II, que es levógira y juntas forman una superestructura de triple hélice que gira hacia la derecha. A nivel molecular, la cadena está formada por tres aminoácidos (GYX), que se repiten a lo largo de la molécula. Se trata de una glicina, seguida de dos prolinas, de las cuales la última se encuentra hidroxilada formando 4-hidroxiprolina. Esto influye en la estabilidad de la molécula y es necesaria para que no se degrade a temperatura corporal (Paredes-Puerto et al., 2017). Pueden ocurrir otras modificaciones como la hidroxilación y glicosilación de residuos de lisina específicos, la eliminación de propéptidos N- y C-terminales por metaloproteasas específicas, después de la secreción en la matriz extracelular, y entrecruzamiento entre cadenas, que se produce en los residuos de hidroxilisina y lisina previamente desaminados por lisil oxidasa. Estas modificaciones afectan tanto a la extractabilidad de los colágenos de los tejidos como a sus características biofísicas (Báez et al., 2005). El colágeno es sintetizado en la célula y expulsado a la matriz extracelular donde sufrirá algunas de las modificaciones antes comentadas.

El colágeno desempeña un papel esencial al proporcionar un andamio para el soporte celular y, por lo tanto, afecta a la unión, migración, proliferación, diferenciación y supervivencia de las células (Yang et al., 2004). Existen 28 tipos de colágeno humano. Este trabajo se centra en el colágeno XI, que desempeña un papel importante en la fibrilogénesis al controlar el crecimiento lateral de los colágenos fibrilares.

Cada protómero de colágeno generalmente está compuesto por tres polipéptidos diferentes, llamados α 1, α 2 y α 3, y codificados por secuencias de genes específicas. En el colágeno de tipo XI, las cadenas α 1 y α 2 están codificadas por los genes *COL11A1* y *COL11A2*, respectivamente; sin embargo, la cadena α 3 está codificada por el gen *COL2A1*, que es el componente principal del colágeno de tipo II. Estos polipéptidos se sintetizan como procolágenos, que incluyen los propéptidos N y C globulares que flanquean la triple hélice del colágeno (Canty & Kadler, 2005). Tras la secreción a la matriz extracelular, los propéptidos se separan por escisión proteolítica; en los extremos



de la molécula de colágeno de triple hélice, quedan los telopéptidos cortos N- y C-terminales (**Figura 1**). Luego, las moléculas de colágeno maduro se autoensamblan en fibrillas, en la superficie celular y/o en la matriz extracelular, a través de enlaces cruzados covalentes entre telopéptidos y regiones específicas de unión de telopéptidos de triple hélice.

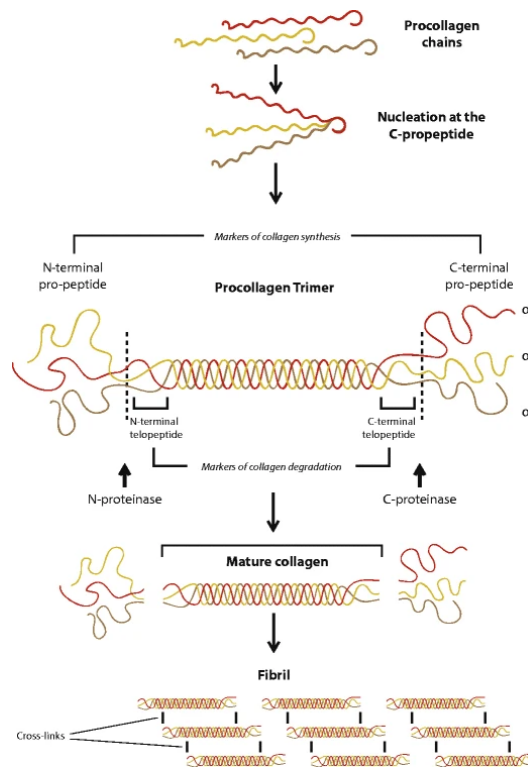


Fig. 1: Representación esquemática de la fibrilogénesis del colágeno (Vázquez-Villa et al., 2015).

En condiciones normales, el gen *COL11A1* se expresa principalmente en condrocitos y células madre mesenquimales, así como en osteoblastos. Las células epiteliales normales y los fibroblastos inactivos de diversas localizaciones no lo expresan. Sin embargo, está altamente expresado por células estromales activadas de diferentes carcinomas invasivos humanos, y esta expresión se correlaciona con la agresividad y progresión del carcinoma y la metástasis a los ganglios linfáticos (Vázquez-Villa et al., 2015).

Estudios previos pusieron de manifiesto la sobreexpresión del gen *COL11A1* en el adenocarcinoma ductal infiltrante de páncreas (García-Pravia et al., 2013). Otros estudios han relacionado mutaciones en este gen con la aparición de carcinomas cutáneos de células escamosas y se ha demostrado que la eliminación de ese gen mutante afecta a la formación del tumor (Lee et al., 2021).



Además, en el crecimiento de algunos tumores sólidos, especialmente de los carcinomas invasivos humanos, se acompaña de una considerable reacción desmoplástica, que consiste en la colagenización del estroma de un tumor (García-Pravia et al., 2013). Diferentes tipos de células están involucradas en esta respuesta, pero destacan las células estromales activadas que sobreexpresan y secretan una variedad de colágenos, estos muestran una disposición a manera de escudo que, por una parte, contribuye a la progresión tumoral, y, por otra, proporciona quimio- y radio-resistencia (Shen et al., 2016). Por estos motivos, la caracterización de la matriz extracelular se está volviendo más importante en la predicción del desarrollo y respuesta a tratamiento de ciertos tipos de tumor (Siravegna et al., 2017).

El reciente desarrollo de formas recombinantes de colágeno humano proporciona una fuente confiable, predecible y químicamente definida de colágeno humano purificado que está libre de componentes animales. Los colágenos de triple hélice producidos mediante tecnología recombinante tienen la misma secuencia de aminoácidos que el colágeno derivado de tejidos humanos. Además, se puede lograr un grado equivalente de hidroxilación de prolina mediante la co-expresión de genes que codifican la prolil hidroxilasa con los genes del colágeno, lo que lleva a la producción de colágeno con un grado similar de estabilidad al material natural (Yang et al., 2004).

2. Objetivo

En este trabajo, se ha perseguido la producción recombinante estable de la cadena $\alpha 1$ del colágeno XI humano, que posee 1806 aminoácidos y una masa molecular estimada de 181065 Da, en células CHO (*Chinese hamster ovary*). Se trata de la primera parte de un proyecto más amplio, que se centra en el estudio de dicho colágeno como potencial diana terapéutica en carcinomas invasivos humanos, mediante el uso de anticuerpos monoclonales frente a la forma extracelular madura del colágeno XI α 1. De modo que, paralelamente a la producción de colágeno, se procederá a conseguir dichos anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas murinos.

Se ha recurrido a las células CHO, como sistema eucariota de expresión recombinante, porque, a día de hoy, representan el principal sistema de expresión para la producción biotecnológica industrial de proteínas de interés terapéutico (Sharker & Rahman, 2021).



3. Materiales y métodos

3.1. Obtención de vector con el gen de interés

Se generó la construcción *COL11A1* OHu25477D pcDNA3.1+/C-(K)-DYK (GenScript) que contiene la secuencia completa del gen *COL11A1* (variante A con 5421 bp) dentro del vector de clonación pcDNA3.1+/C-(K)-DYK.

Este vector contiene, como se muestra en la **Figura 2**, un potenciador de citomegalovirus (CMV), un promotor de CMV, un promotor del fago T7, y una secuencia Kozak precediendo al marco abierto de lectura (ORF) que contiene el gen de interés; además, al final de esta secuencia, existe una señal de poliadenilación. También tiene genes de resistencia procariotas (AmpR) y eucariotas (NeoR) para la selección de las células transformadas, y un único punto de corte para el enzima *Pvu* I que permite su linealización.

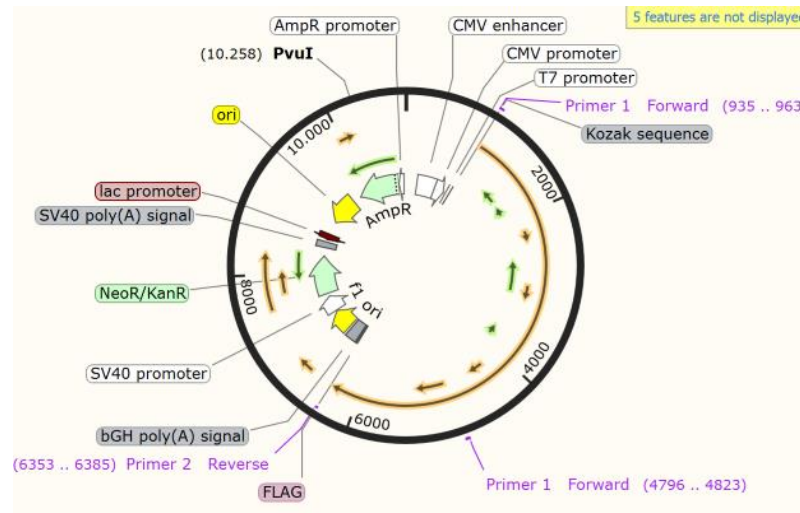


Fig. 2: Representación del vector *COL11A1* OHu25477D pcDNA3.1+/C-(K)-DYK, donde se muestra la posición de las partes más relevantes de dicho vector. Tiene un tamaño de 10811 bp. (SnapGene Viewer)

3.2. Amplificación del vector

Se procedió a la amplificación del vector pcDNA3.1+/C-(K)-DYK que contiene la secuencia completa del gen *COL11A1* en células One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. Coli* (Invitrogen).

Primero, se descongelaron las células en un baño a 37°C. Una vez descongeladas, se les añadió 1 µL de plásmido y se dejaron en hielo durante 30 min. Se las sometió a choque térmico poniendo el vial en un baño a 42°C durante 30 segundos y otra vez en hielo. Por último, se añadió 250 µL de medio S.O.C. precalentado y se incubó durante 1h a 37°C.



Se sembraron en placas Petri de medio Luria-Bertani con agar al 1% y 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina como antibiótico de selección de las bacterias transformadas y se incubaron 24 h a 37°C. Pasado ese tiempo, se picaron 5 colonias, se colocaron en tubos Falcon con 2 mL de medio LB líquido con ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) y se dejaron incubar. Tras la incubación, se repartieron los 2 mL del tubo con mayor densidad celular en 10 tubos Falcon con 10 mL de medio y se incubaron a 37°C durante 24h. Este proceso se repitió varias veces con el objetivo de tener mayor cantidad de plásmido.

3.3. Extracción y purificación del ADN plasmídico

Se realizó utilizando el kit comercial peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (VWR Life Science), que permite extraer ADN plasmídico de volúmenes grandes de medio con células. Una vez extraído, se cuantificó en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 260 nm.

3.4. Linearización del plásmido y electroforesis en gel de agarosa

Se añadió el ADN a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 μL de enzima de restricción *Pvu* I, 2 μL de buffer R y agua destilada hasta un volumen final de 20 μL . Se dejó durante 16h a 37°C. Pasado ese tiempo, se inactivó el enzima con un 1 μL de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético, 0,5M, pH 8,0).

Después, para comprobar que el plásmido se había amplificado y purificado y linearizado correctamente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% al que se añadió un agente intercalante (SYBR™ Safe DNA Gel Stain). Se cargaron las muestras de plásmido digerido y sin digerir con 5 μL de tampón de carga y un volumen total de 25 μL . Se corrió el gel durante 1h a 90V.

3.5. Concentración y esterilización del plásmido

Para realizar la transfección es necesario preconcentrar el plásmido y mantenerlo en condiciones estériles. Por lo que se realizó una precipitación con etanol. Se usó acetato de sodio (pH 5,2), añadiendo 1/10 del volumen total de ADN plasmídico y 2,5 volúmenes de etanol 100%. Se dejó a -20° C hasta el día siguiente. Se centrifugó durante 30 minutos a 12000 rpm y se retiró el sobrenadante cuidadosamente. Se hizo un lavado con EtOH al 70%, para eliminar las sales; se volvió a centrifugar 10 min, se retiró el EtOH y se dejó secar 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió el ADN en el



volumen de agua necesario. Todo el proceso se realizó en una cabina de flujo laminar para conseguir la máxima esterilidad.

3.6. Cultivo de células CHO-S

Se descongeló 1 mL de células FreeStyle™ CHO-S (ThermoFisher) con una densidad celular de 1×10^7 /mL poniendo el vial en un baño a 37°C durante unos minutos. Se pasó todo el volumen a un frasco T-75 con 30 mL de medio FreeStyle™ CHO Expression Medium (ThermoFisher) previamente suplementado con L-Glutamina a una concentración de 8mM y al que se le había realizado una prueba de esterilidad. Se incubó a 37°C con un 5% de CO₂ y agitación orbital (120 rpm).

Cada 2 o 3 días se fueron haciendo subcultivos. Se guardaron varias copias de seguridad de 1 mL congeladas en medio de cultivo con DMSO al 10%, y se realizaron varios pases antes de la transfección, para asegurarse de que las células crecieran correctamente y sin formar grumos.

La **Figura 3** muestra el aspecto de las células CHO-S en cultivo.

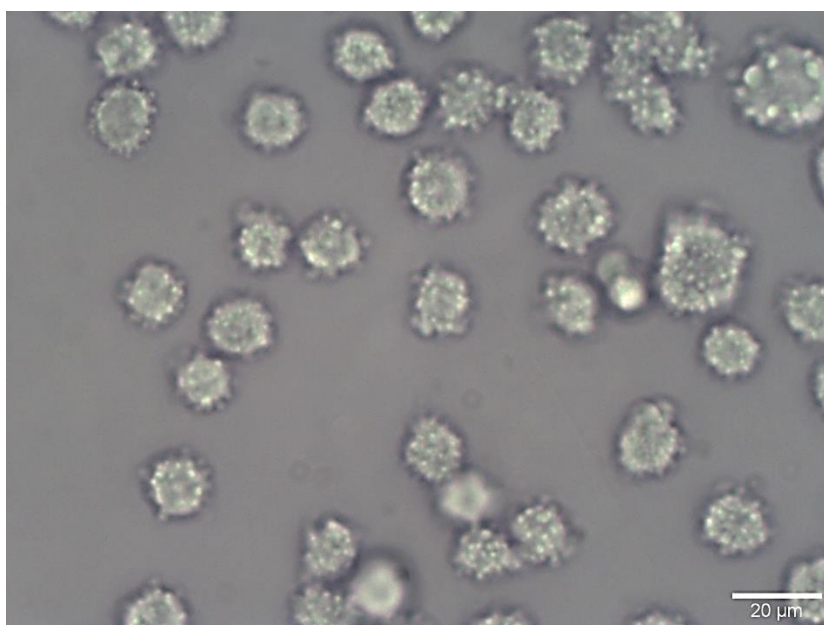


Fig. 3: Fotografía al microscopio invertido con aumento 20X del cultivo de células CHO-S, tras cinco subcultivos.

3.7. Determinación de la mínima dosis letal de geneticina

Para determinar la mínima dosis letal de geneticina para las células CHO-S, se sembraron 6 frascos T-75 con una densidad celular de 1×10^6 células/mL, ya que es la densidad óptima para la transformación, y se añadieron diferentes concentraciones de geneticina (300, 400, 500, 600, 1000 y 2000 μ g/mL). Se comprobó la letalidad a los 5 y



los 7 días de añadir el fármaco, usando azul tripán para teñir las células muertas y contándolas en una cámara de Neubauer.

3.8. Transfección de células CHO-S

Para proceder a la transfección, la densidad celular óptima es de 1×10^6 células/mL, como se mencionó anteriormente, por lo que el primer paso es contar las células y repartirlas de manera que queden con dicha densidad. Se pone un volumen de 30 mL en medio FreeStyle™ CHO Expression Medium (ThermoFisher) en un matraz de 125 mL.

Se siguió el protocolo especificado por la casa comercial. Se mezclaron 41 μ L del plásmido preconcentrado (que corresponden apróx. a 39 μ g de ADN) con el medio de transfección SFM OptiPRO™ (ThermoFisher) hasta un volumen final de 0,6 mL. Se hizo lo mismo con 41 μ L de reactivo FreeStyle™ MAX (ThermoFisher) y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces. Inmediatamente, se mezcló el reactivo con el ADN, obteniendo un volumen de 1,2 mL y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, de manera que se van formando complejos con el ADN. Por último, se añadió la mezcla a las células, lentamente y moviendo el frasco para que el ADN se distribuya homogéneamente. Se incubó a 37° con un 5% de CO₂ y agitación orbital a 120 rpm.

Tras dos días de cultivo, se recogieron las células en un tubo cónico y se centrifugaron 10 min a 1200 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en medio fresco con 500 μ g/mL de geneticina.

Se realizó la transfección con el plásmido circular y con el linearizado (usando el enzima PvuI).

3.9. Separación de las células y concentración del medio de cultivo tras transformación

Siete días después de la transformación, se recogieron 15×10^6 células y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. El botón celular se resuspendió en 1 mL de agua destilada y 330 μ L de buffer de electroforesis y se lisaron las células poniéndolas 3 minutos a 95°C. Por otro lado, se recogió el sobrenadante y se le añadió azida sódica hasta un 0,1%.

Se hizo lo mismo con medio y células CHO-S sin transfectar para poder comparar ambos resultados.

Fue necesario concentrar los sobrenadantes para su análisis. Se usaron tubos de concentración de proteínas de 10K y se centrifugaron 20 mL de cada muestra a 4000 rpm



y 4°C hasta obtener 1mL de medio concentrado. La concentración de proteínas se estimó midiendo la absorbancia a 280 nm.

3.10. SDS-PAGE

Para el análisis de los sobrenadantes de los medios de cultivo, se realizaron dos electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). Se preparó un gel de concentración con acrilamida al 6% (pH=6,8) y un gel de separación con un 8% de acrilamida (pH=8,8).

Se cogieron 75 µL de cada muestra y se le añadieron 25µL de tampón de carga, con β-mercaptoetanol, 4% SDS, 20% glicerol, 200mM DTT, 0.01% azul de bromofenol y 0.1 M Tris HCl. Ambas muestras se calentaron durante 3 minutos a 90°C para favorecer la desnaturalización. Después, se cargaron en los geles 20 µL de cada muestra y 10 µL de un marcador de peso molecular (Estándar de proteínas teñidas PageRuler™ Plus, ThermoFisher), que va de 10 a 250 kDa. La electroforesis se realizó a máximo voltaje (250V) durante 6 minutos y, tras esto, una hora a 70 mA.

3.10.1. Tinción con azul de Coomassie

Uno de los dos geles se tiñó con azul de Coomassie durante 1h con agitación suave. Después de destiñó usando una mezcla de 50% metanol y 10% ácido acético y se realizó un último lavado con etanol 70%.

3.10.2. Western blot

El otro gel se sometió a una electrotransferencia, de manera que las proteínas pasaron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó a 600 mA durante 1 hora.

Una vez finalizada, se dejó la membrana bloqueando en una solución de PBS-BSA (albúmina de suero bovino) al 3% a 4°C hasta el día siguiente. Después, se retiró la solución de bloqueo, y se hicieron lavados con buffer de lavado (PBS-Tween 20 0,01%). Posteriormente, la membrana se incubó con 10 mL de BSA 1% con el anticuerpo monoclonal THE™ DYKDDDDK Tag Antibody [HRP], mAb, Mouse (GenScript, Cat. No. A01428) (3-5 µg/calle con muestra). Se dejó en agitación suave, durante 2 h, a temperatura ambiente. Y, después de varios pasos de lavado con PBS-Tween-20 al 0,01 %, se añadió el sustrato de la HRP 1-Step™ Ultra TMB (ThermoFisher Scientific, Cat. No. 37574).



3.11. Cultivo de células CHO DG44 *dhfr*

Se descongeló 1 vial de 1 mL de células CHO DG44 *dhfr* poniendo el vial en un baño a 37°C. Una vez descongeladas, se pasó todo el volumen a un tubo Falcon de 15 mL al que se le añadió lentamente 10 mL de medio DMEM (suplementado con L-Glutamina 4mM, hipoxantina 0,1 mM, timidina 0,016 mM y suero bovino fetal al 10%). Se centrifugó 10 min a 1200 rpm y se retiró el sobrenadante, con el fin de eliminar todo el DMSO (dimetilsulfóxido) que venía con el medio de congelación. El botón celular se resuspendió en 10 mL de medio y se pasó todo el volumen a un frasco T75 con 20 mL más de medio. Las células se cultivaron a 37°C con un 5% de CO₂.

La **Figura 4** muestra el típico aspecto de los cultivos adherentes de las células CHO DG44 *dhfr*.



Fig. 4: Fotografía al microscopio invertido con aumento 20X del cultivo de células CHO DG44, tres días después de descongelarlas.

Para los subcultivos de las células DG44, se aspiró el medio de cultivo, se hizo un lavado con 10 mL de PBS (phosphate buffered saline) para retirar los posibles restos de suero, y se añadieron 4 mL de tripsina-EDTA, que se dejaron unos 5 minutos a 37°C para que las células se despeguen. Finalmente, se añadió el medio de cultivo y se repartieron las células según fuera necesario. Se realizaron copias de seguridad en cada subcultivo.

Con el objetivo de adaptar las células a crecer en suspensión en el medio Gibco™ CD DG44 (Invitrogen), que no tiene suero bovino fetal ni proteínas, se fue introduciendo dicho medio de manera gradual, como muestra la **Tabla 1** («Streamlined Serum-Free Adaptation of CHO-DG44 Cells», 2019, p. 44). A partir del día 25, se sometieron a agitación orbital (120 rpm) para que empezasen a crecer en suspensión.

**Tabla 1:** Protocolo de adaptación de las células CHO DG44 al medio CD DG44.

Día	Suero bovino fetal	Medio CD
0	10,00%	0%
4	10,00%	0%
8	5,00%	50%
12	5,00%	75%
15	2,50%	90%
18	1,25%	100%
22	1,00%	100%
25	0,75%	100%
29	0,30%	100%
32	0,15%	100%
36	0,00%	100%

4. Resultados y discusión

4.1. Amplificación, purificación y linearización del plásmido

De los varios lotes de plásmido pcDNA3.1+/C-(K)-DYK amplificado, se obtuvieron diferentes concentraciones, como se muestra en la **Tabla 2**. De cada lote se obtuvo un volumen final de 1 mL, aproximadamente. Se hicieron diluciones previas a la cuantificación con el objetivo de evitar errores de medida.

Tabla 2: Resultados obtenidos en los 4 pases de amplificación del vector COL11A1 OHu25477D pcDNA3.1+/C-(K)-DYK

Lote	Dilución	Absorbancia (a 260 nm)	Concentración (µg/mL)
1	1:20	0,029	29
2	1:50	0,079	197,5
3	1:50	0,032	80
4	1:50	0,124	310
5	1:50	0,020	50
6	1:50	0,102	250
7	1:50	0,090	225

Sin embargo, de esos cuatro lotes solo tres tenían el vector esperado, como se comprobó mediante electroforesis (**Figuras 5, 6 y 7**). En la **Figura 5**, solo se observan



líneas en las calles C1 y D1, sin contar la del marcador, lo que indica que el ADN del segundo lote o bien estaba degradado o no había. La calle D1 presenta dos bandas, a pesar de que solo hay un sitio de corte de *Pvu* I en el vector; este resultado puede deberse a que el plásmido linearizado se enrolla sobre sí mismo, adoptando dos conformaciones preferentes (las más favorables termodinámicamente) que poseen diferentes movilidades electroforéticas, de manera que se observan dos bandas que, además, no se corresponden con el tamaño esperado del plásmido (10 kb).

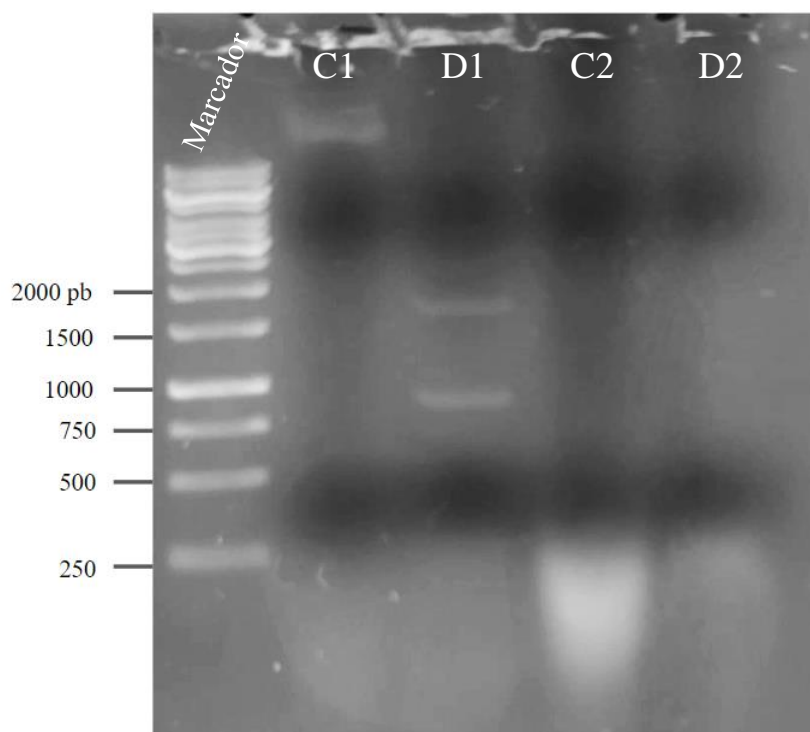


Fig. 5: Resultado de la electroforesis de los lotes 1 y 2. C1 es el plásmido sin digerir y D1 es el plásmido digerido del lote 1. Mientras que C2 y D2 son los plásmidos sin digerir y digerido, respectivamente, del lote 2.

En la **Figura 6**, se observa que había ADN en el tercer lote y que se digirió correctamente; en este caso se cargaron dos concentraciones diferentes de plásmido digerido para evitar errores. Además, se volvió a cargar el plásmido del lote 2, obteniéndose el mismo resultado que en el gel anterior.

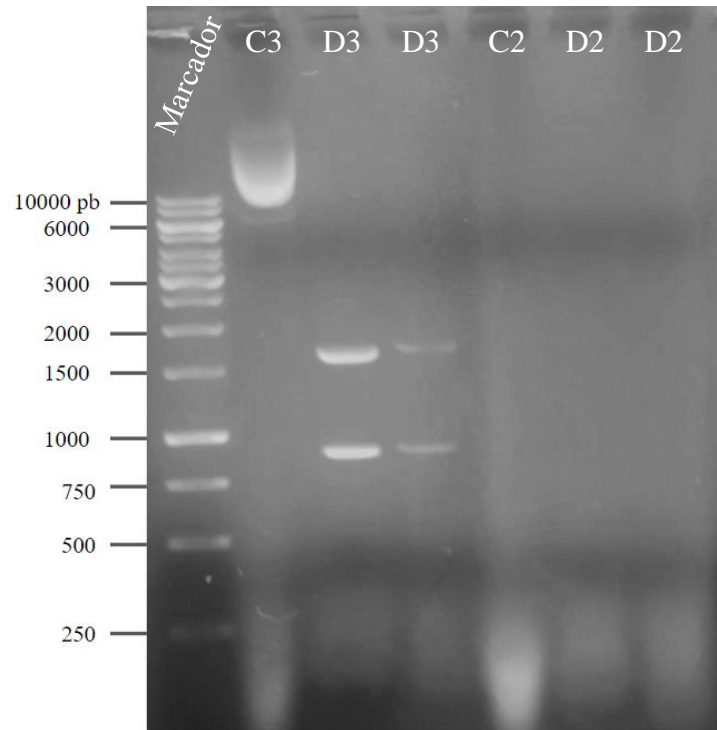


Fig. 6: Resultado de la electroforesis de los lotes 2 y 3. C3 es el plásmido sin digerir y D3 es el plásmido digerido del lote 3, del que se añadieron dos concentraciones diferentes. Mientras que C2 y D2 son los plásmidos sin digerir y digeridos, respectivamente, del lote 2.

En vista de los resultados de la **Figura 7**, se puede concluir que había ADN en el lote 4 y que, además, se trataba del plásmido esperado.

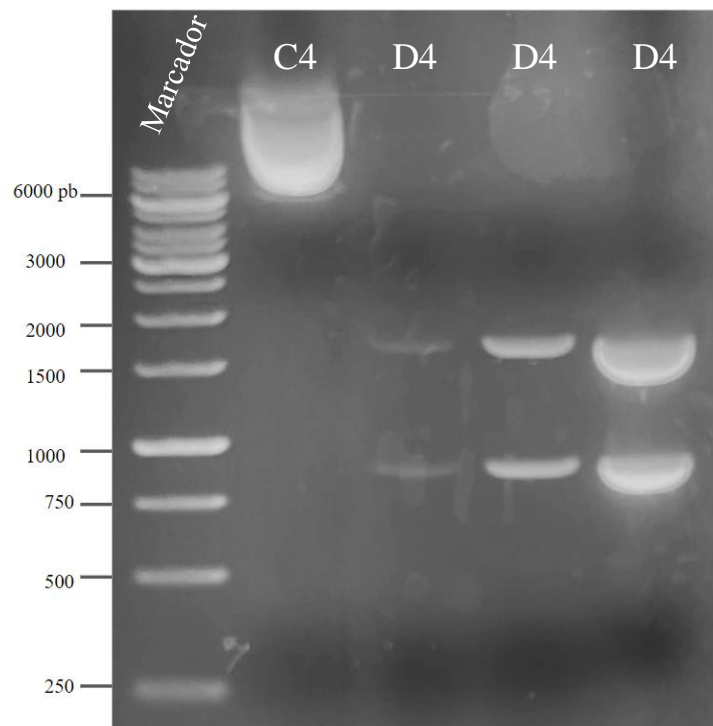


Fig. 7: Resultado de la electroforesis del lote 4. C4 es el plásmido sin digerir y D4 es el plásmido digerido, del que se analizaron tres concentraciones diferentes.



Como todos los lotes de plásmido fueron extraídos de la misma colonia de bacterias, a partir del lote 4 se consideró que no era necesario hacer más comprobaciones por electroforesis.

4.2. Mínima dosis letal de geneticina para las células CHO-S

Se comprobó la letalidad a los 5 (en algunos casos) y 7 días de añadir el fármaco, los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Porcentaje de células muertas sobre el total de células CHO-S (letalidad) con diferentes concentraciones de antibiótico a los 5 y 7 días.

Concentración geneticina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Letalidad 5 días	Letalidad 7 días
300	48%	100%
400	-	100%
500	73%	100%
600	-	100%
1000	100%	100%
2000	100%	100%

En vista de estas observaciones y de acuerdo con los datos consultados, se decidió aplicar una concentración inicial de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de geneticina para proceder a una primera selección de transformantes derivados de la exposición al plásmido COL11A1_OHu25477D_pcDNA3.1+/C-(K)-DYK.

4.3. Transfección con plásmido circular en células CHO-S

Este TFG fue inicialmente planificado persiguiendo la expresión estable en células CHO DG44 *dhfr*, adaptadas a crecer en medios químicamente definidos y en suspensión, por medio de la utilización de plásmidos integrativos portadores de la marca de selección DHFR y con la posibilidad de amplificación de los mismos al integrarse varias copias por genoma.

En años pasados, estas células estaban libremente disponibles, pero recientemente, dada su significación biotecnológica, hubieran tenido que ser adquiridas a un precio que excedía notablemente nuestro presupuesto inicial.

Alternativamente y de manera exploratoria, se ha recurrido a células CHO-S, más asequibles y que están también adaptadas a crecer en suspensión, en medios químicamente definidos, a la vez que a partir de formas adherentes de células CHO DG44



dhfr cultivadas en medios convencionales, se ha perseguido su adaptación a un medio químicamente definido (el medio CD DG44 de ThermoFisher Scientific) y a cultivos en suspensión.

4.3.1. Viabilidad celular

Se realizaron dos intentos de transformación de las células CHO-S con el plásmido circular:

- 1^{er} intento

Los resultados de la viabilidad celular antes y después de la transfección se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Evolución con el tiempo de la viabilidad de las células CHO-S transformadas. La geneticina se añadió a los dos días de la transfección.

Tiempo	Viabilidad
Antes de la transfección	97,4%
48h tras la transfección (sin geneticina)	90,1%
5 días con geneticina	49,7%
7 días con geneticina	0%

En vista de los resultados obtenidos, se puede deducir que, en esta ocasión, no se consiguieron transfectantes estables, pues no sobrevivieron a la exposición a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de geneticina.

- 2^o intento

En este segundo intento se optó por no añadir geneticina y se analizaron los resultados 7 días después de la transformación, y se añadió geneticina tras esos 7 días. En la **tabla 5** se muestra la viabilidad celular.

Tabla 5: Evolución con el tiempo de la viabilidad de las células CHO-S transformadas.

Tiempo	Viabilidad
Antes de la transfección	97,2%
5 días tras la transfección	64,5%
7 días tras la transfección	20,4%
12 días tras la transfección (5 días con geneticina)	0%



La transfección provocó una gran disminución de la viabilidad, a pesar de no haber añadido geneticina, aunque la muerte celular también pudo deberse a que no se cambió el medio de cultivo durante 7 días, de manera que las células pudieron quedarse sin algunos nutrientes.

Tras añadir geneticina, todas las células murieron, lo que indica que no se expresó el gen de resistencia o se hizo de forma transitoria, es decir; la transfección no fue efectiva.

4.3.2. Análisis mediante SDS-PAGE y western blot

- 1^{er} intento

En este intento solo se analizó el medio de cultivo, ya que la proteína debería ser excretada al medio extracelular.

Tras concentración de los sobrenadantes de los medios de cultivo, la concentración final de proteína en el medio de las células transfectadas fue tres veces mayor que el de las células control, por lo que fue necesario diluirlo para igualar ambas concentraciones.

En SDS-PAGE, se cargaron aproximadamente 1,2 μ g de proteína en cada calle.

Las **Figuras 8 y 9** muestran los resultados de los análisis mediante SDS-PAGE y Western blot.

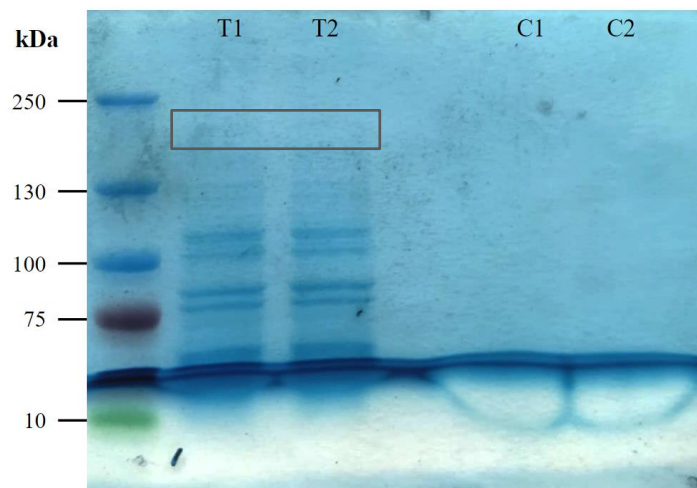


Fig. 8: Resultado del SDS-PAGE tras la tinción del gel con azul de Coomassie. Se cargó dos veces cada muestra. “C” corresponde con el control, es decir el sobrenadante de células sin transfectar, mientras que “T” es el sobrenadante de las células transformadas. En el recuadro se señala la región del gel correspondiente a 180 kDa aproximadamente.

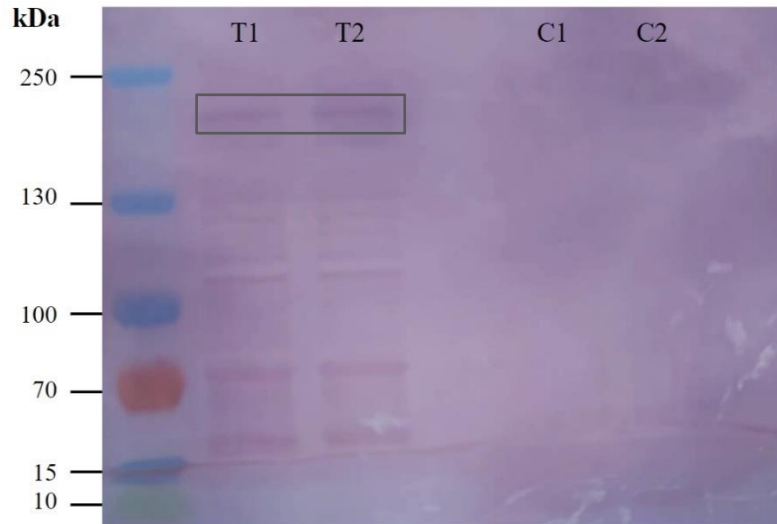


Fig. 9: Resultado del Western blot con el anticuerpo THE™ DYKDDDDK Tag Antibody [HRP]. Se cargó dos veces cada muestra. “C” corresponde con el control, es decir el medio de cultivo de células sin transfectar, mientras que “T” es el medio de las células transformadas. En el recuadro se señala la región del gel correspondiente a 180 kDa aproximadamente.

Ni en el gel (**Figura 8**) ni en la membrana (**Figura 9**) se observan bandas en las calles con la muestra control, lo que indica que el medio de cultivo de las células sin transfectar es muy pobre en proteínas o se cargó muy poca cantidad. Sin embargo, en la otra muestra se observan muchas bandas en ambas figuras; esto es debido a que prácticamente el total de las células transfectadas estaban muertas cuando se recogió el medio, por lo que éste contenía muchas proteínas intracelulares provenientes de células que se lisaron tras morir.

La presencia de múltiples bandas en el western blot puede indicar que el anticuerpo, en exceso, se unió de forma inespecífica a múltiples proteínas. Pero existe una banda bien definida en la región de 180 kDa que se observa en la membrana, y no el gel; esto puede deberse a que había poca cantidad de esa proteína (de manera que no se ve con la tinción) pero se unieron muchos anticuerpos a ella, lo que sugiere que podría ser la proteína de interés, la cadena $\alpha 1$ del procolágeno XI humano, que tiene una masa molecular estimada de 181065 Da (180 kDa) que coincide con la zona del gel donde se ve esa banda.

Si estas conclusiones son ciertas, las células CHO-S pudieron expresar el procolágeno XI α 1 humano recombinante de forma transitoria. Para conseguir la expresión estable, se realizó un segundo intento de transformación con el plásmido linearizado.

- 2° intento

En este segundo intento, además de analizar el medio de cultivo de las células, se analizó el lisado celular mediante SDS-PAGE (por duplicado) y western blot, para comprobar si se pudiera haber producido la proteína de forma intracelular.

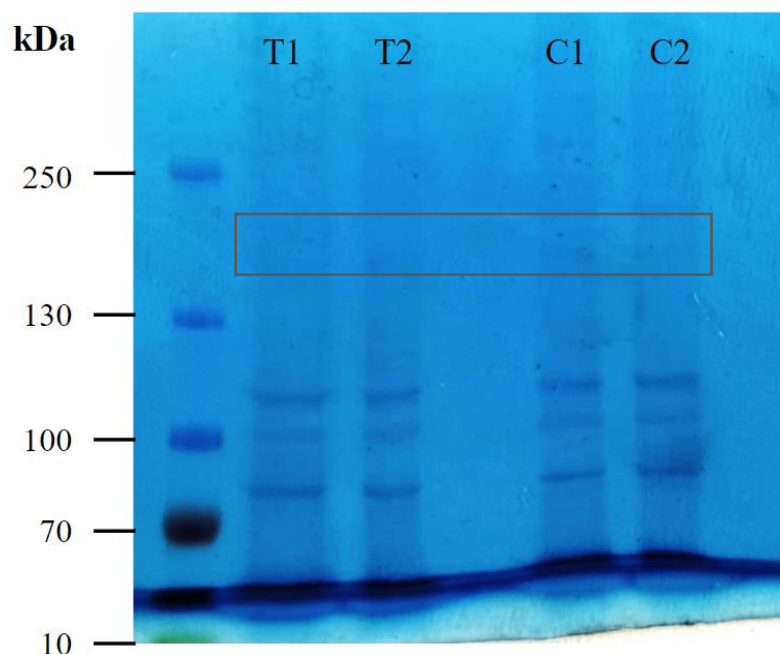


Fig. 10: Resultado del SDS-PAGE tras la tinción del gel con azul de Coomassie. Se cargó dos veces cada muestra. “C” corresponde con el control, es decir el lisado de células sin transfectar, mientras que “T” es el lisado de las células transformadas. En el recuadro se señala la región del gel correspondiente a 180 kDa aproximadamente.

Como muestra la **Figura 10**, no se observan diferencias en el patrón de bandas entre el lisado de células control y el lisado de células transfectadas. En el área del gel correspondiente a 180 kDa, se puede ver una ligera banda, pero está presente en ambas muestras (más claramente en el control), de manera que se trata de alguna proteína intracelular propia de las CHO-S. Este resultado apunta a que el colágeno XI α I no se produjo de forma intracelular.

Se repitió el SDS-PAGE con las muestras del lisado celular y del medio de cultivo celular concentrado, para asegurar los resultados y comprobar si las células pudieron producir la proteína y secretarla al medio.

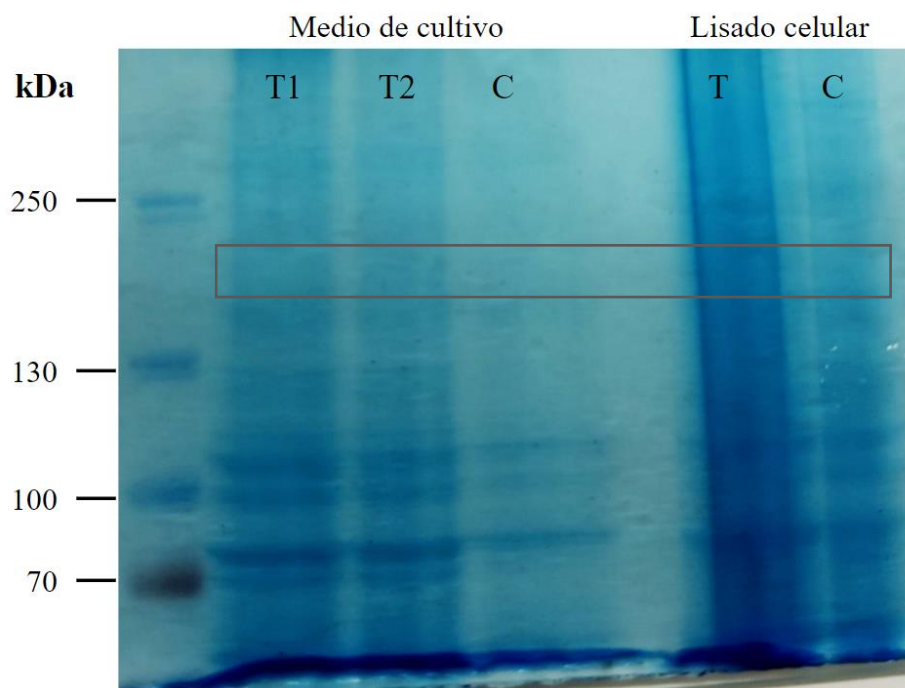


Fig. 11: Resultado del SDS-PAGE tras la tinción del gel con azul de Coomassie. Las tres calles de la izquierda (sin contar el marcador), fueron cargadas con las muestras del medio de cultivo concentrado; “C” es la calle con la muestra de medio de cultivo de células CHO-S sin transformar, mientras que “T” corresponde al medio de las células transformadas. Se cargó la muestra dos veces poniendo 7,5 μ g (T1) y 5,4 μ g de proteína (T2). Las dos calles de la derecha fueron cargadas con las muestras del lisado celular; “C” corresponde al control, es decir el lisado de células sin transfectar, mientras que “T” es el lisado de las células transformadas. En el recuadro se señala la región del gel correspondiente a 180 kDa aproximadamente.

En la **Figura 11**, se confirman los resultados previamente obtenidos con el lisado celular; no se ven diferencias en el patrón de bandas entre el lisado de las células CHO-S normales y las transformadas. Respecto al medio de cultivo, tampoco se ven bandas diferentes; las células transformadas parecen tener mayor cantidad de proteína en el medio de cultivo, seguramente debido al alto porcentaje de muerte celular.

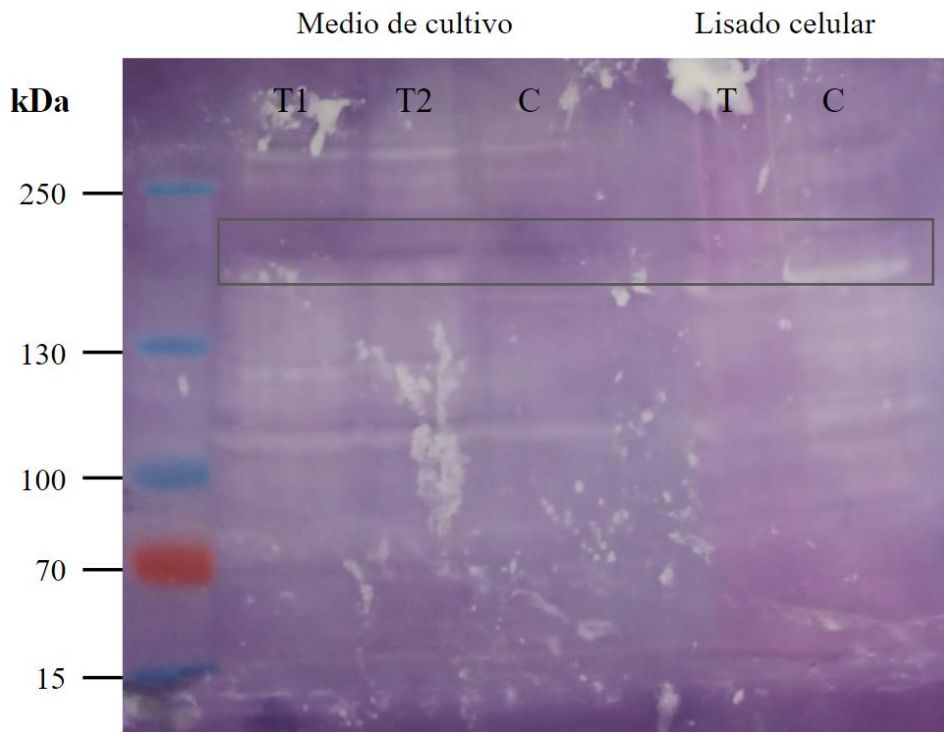


Fig. 12: Resultado del Western blot con el anticuerpo THE™ DYKDDDDK Tag Antibody [HRP]. Las tres calles de la izquierda (sin contar el marcador), fueron cargadas con las muestras del medio de cultivo concentrado; “C” es la calle con la muestra de medio de cultivo de células CHO-S sin transformar, mientras que “T” corresponde al medio de las células transformadas. Se cargó la muestra dos veces poniendo 7,5 μg (T1) y 5,4 μg de proteína (T2). Las dos calles de la derecha fueron cargadas con las muestras del lisado celular; “C” corresponde al control, es decir el lisado de células sin transfectar, mientras que “T” es el lisado de las células transformadas. En el recuadro se señala la región del gel correspondiente a 180 kDa aproximadamente.

Los resultados del Western blot se muestran en la **Figura 12**. En las tres calles con muestras de medio de cultivo se observan patrones de bandas similares; se puede ver una banda en la región de 180 kDa, pero aparece tanto en el control como en las células CHO-S transfectadas.

En las dos calles con muestras del lisado celular podemos observar también esa banda de 180 kDa, que se ve más claramente en la muestra control.

Todo esto indica que las células CHO-S presentan unas proteínas intracelulares y extracelulares que tienen un tamaño similar al de nuestra proteína de interés y que generan una unión inespecífica con el anticuerpo THE™ DYKDDDDK Tag Antibody. No hay indicios claros de que se haya producido el procolágeno XI α 1 humano.



4.4. Transfección con plásmido linearizado en células CHO-S

4.4.1. Viabilidad celular

Los resultados de la viabilidad celular antes y después de la transfección se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Evolución con el tiempo de la viabilidad de las células CHO-S transformadas con el plásmido lineal.

Tiempo	Viabilidad
Antes de la transfección	88,5%
48h tras la transfección (sin geneticina)	60,6%
5 días con geneticina	≤1%
7 días con geneticina	0%

De nuevo los resultados apuntan a que no hubo transfección estable, ya que las células no sobrevivieron a la geneticina.

4.5. Adaptación de las células CHO DG44

Las células CHO DG44, inicialmente cultivadas en un medio convencional con 10% de suero bovino fetal, fueron adaptándose a un medio químicamente definido sin suero. Se siguió un método de adaptación progresiva al medio definido sin suero y al cultivo en suspensión (como se mostró en la **Tabla 1**), pero las células no sobrevivieron a partir del día 25 (0,75% FBS y 100% medio CD) al ponerlas en agitación. De manera que se optó por cultivarlas de forma adherente hasta conseguir la adaptación al 0% de suero, que se logró sin ningún inconveniente.

5. Conclusiones

1. Las células CHO DG44 *dhfr*, inicialmente adherentes y cultivadas en un medio convencional con 10% de suero bovino fetal, han sido llevadas progresivamente hacia un medio químicamente definido sin suero, pero no se han adaptado aún a cultivo en suspensión.
2. Tras varios intentos de transformación, no se ha conseguido la expresión recombinante fiable del procolágeno XI α 1 humano en células CHO-S.



6. Bibliografía

- Báez, J., Olsen, D., & Polarek, J. W. (2005). Recombinant microbial systems for the production of human collagen and gelatin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(3), 245-252. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0180-x>
- Canty, E. G., & Kadler, K. E. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 7), 1341-1353. <https://doi.org/10.1242/jcs.01731>
- García-Pravia, C., Galván, J. A., Gutiérrez-Corral, N., Solar-García, L., García-Pérez, E., García-Ocaña, M., Del Amo-Iribarren, J., Menéndez-Rodríguez, P., García-García, J., de Los Toyos, J. R., Simón-Buela, L., & Barneo, L. (2013). Overexpression of COL11A1 by cancer-associated fibroblasts: Clinical relevance of a stromal marker in pancreatic cancer. *PloS One*, 8(10), e78327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078327>
- Lee, C. S., Siprashvili, Z., Mah, A., Bencomo, T., Elcavage, L. E., Che, Y., Shenoy, R. M., Aasi, S. Z., & Khavari, P. A. (2021). Mutant collagen COL11A1 enhances cancerous invasion. *Oncogene*, 40(44), 6299-6307. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02013-y>
- Paredes-Puerto, A., Camacho-Villegas, T., Vallejo-Cardona, A., Esquivel-Solís, H., Paredes-Puerto, A., Camacho-Villegas, T., Vallejo-Cardona, A., & Esquivel-Solís, H. (2017). Colágenas Recombinantes para Andamios de Ingeniería de Tejidos. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 38(1), 103-114. <https://doi.org/10.17488/rmib.38.1.7>
- Sharker, S. M., & Rahman, A. (2021). A Review on the Current Methods of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells Cultivation for the Production of Therapeutic



Protein. *Current Drug Discovery Technologies*, 18(3), 354-364.

<https://doi.org/10.2174/1570163817666200312102137>

Shen, L., Yang, M., Lin, Q., Zhang, Z., Zhu, B., & Miao, C. (2016). COL11A1 is overexpressed in recurrent non-small cell lung cancer and promotes cell proliferation, migration, invasion and drug resistance. *Oncology Reports*, 36(2), 877-885. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4869>

Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(9), 531-548. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>

Streamlined Serum-Free Adaptation of CHO-DG44 Cells. (2019, septiembre 26).

BioProcess International. <https://bioprocessintl.com/upstream-processing/cell-culture-media/streamlined-serum-free-adaptation-of-cho-dg44-cells-using-a-novel-chemically-defined-medium/>

Vázquez-Villa, F., García-Ocaña, M., Galván, J. A., García-Martínez, J., García-Pravia, C., Menéndez-Rodríguez, P., González-del Rey, C., Barneo-Serra, L., & de Los Toyos, J. R. (2015). COL11A1/(pro)collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal cells and carcinoma progression. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(4), 2213-2222.

<https://doi.org/10.1007/s13277-015-3295-4>

Yang, C., Hillas, P. J., Báez, J. A., Nokelainen, M., Balan, J., Tang, J., Spiro, R., & Polarek, J. W. (2004). The Application of Recombinant Human Collagen in Tissue Engineering. *BioDrugs*, 18(2), 103-119.

<https://doi.org/10.2165/00063030-200418020-00004>