

# Rearreglos cromosomales en la amplificación del gen quimérico del antígeno de superficie de la hepatitis B-dihidrofolato reductasa de ratón en células de ovario de hamster chino

A. PÉREZ, M. P. RODRÍGUEZ, L. HERNÁNDEZ, J. DE LA FUENTE y L. HERRERA

Agrupación de Genética de Células de Mamíferos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado 6162, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en marzo de 1990

Aprobado en abril de 1990

## RESUMEN

Recientemente nosotros expresamos el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en células CHO utilizando el sistema de amplificación DHFR/metotrexate (Pérez *et al.*, 1988).

En este trabajo reportamos el estudio de las secuencias integradas en el genoma celular producto de la transfección y su evolución durante el proceso de amplificación. Los resultados obtenidos indican que en los clones analizados, la información transfectada posee rearrreglos originados durante el proceso de amplificación y que el amplicón contiene fragmentos génicos del hospedero. Se concluye también que el ADN plasmídico integrado en el genoma celular posee frecuentes deleciones. Se discute un modelo del amplicón.

## SUMMARY

We have recently expressed the hepatitis B surface antigen in CHO cells using the DHFR/methotrexate amplification system (Pérez *et al.*, 1988).

In the work described in this report, we present the results from the study of the sequences integrated into the cellular genome as a result of the transfection procedure and its evolution during the amplification process. The results obtained indicates that, at least in the analyzed clones, the transfected chimeric genes posses rearrangements originated during the amplification process and the amplicon contains host genomic fragments. We also conclude that the plasmid DNA integrated into the cellular genome has frequent deletions. A model for the found amplicon is discussed.

## INTRODUCCION

En los últimos años, la amplificación de genes de mamíferos como resultado del aumento paulatino en las concentraciones de agentes selectivos ha sido objeto de numerosos estudios. Los mecanismos que gobiernan esta amplificación génica no están totalmente esclarecidos, pudiendo ser el resultado de algún proceso de re-replicación o consecuencia de algunos mecanismos de recombinación. No obstante, todo parece indicar que cualquier gen para el cual exista un agente selectivo puede ser amplificado (Hamlin *et al.*, 1984; Stark y Wahl, 1984; Schimke, 1984).

En células de hamster chino y sirio, los genes amplificados como la dihidrofolato reductasa (DHFR) y el CAD se encuentran en una o en más localizaciones cromosomales, detectados inicialmente como regiones cromosomales anormales o teñidas uniformemente (Biedler y Spengler, 1976; Milbrandt *et al.*, 1981; Nunberg *et al.*, 1978; Wahl *et al.*, 1982).

En células de mamíferos se ha encontrado, además, que las secuencias amplificadas (amplicones) contienen grandes fragmentos

génicos del hospedero y que estas son diferentes en largo y estructura (Guilotto *et al.*, 1986; Looney y Hamlin, 1987; Ma *et al.*, 1988).

La amplificación y expresión de genes cotransfectados con el ADNc del gen de la DHFR ha sido utilizada por varios autores para la obtención de proteínas de interés, a partir del cultivo de células de mamíferos (Kaufman y Sharp, 1982; Scahill *et al.*, 1983; Pérez *et al.*, 1988).

En nuestro laboratorio hemos estudiado la expresión y amplificación del gen quimérico del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) unido al ADNc de la DHFR de ratón en células CHO deficientes en DHFR. Los resultados obtenidos indican que en los clones analizados la información transfectada posee rearrreglos originados durante el proceso de amplificación y que el amplicón contiene fragmentos génicos del hospedero. Se concluye también que el ADN plasmídico integrado en el genoma celular posee frecuentes deleciones.

## MATERIALES Y METODOS

### Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en el trabajo se obtuvieron según lo reportado previamente (Pérez *et al.*, 1988).

### Análisis del ADN genómico y expresión génica

El análisis del ADN genómico se realizó mediante hibridación por Southern (Southern, 1975) según se describe en Pérez *et al.*, 1988. En las diferentes hibridaciones se utilizaron como sondas las siguientes:

**Detección del gen del HBsAg.** El gen S del virus de la hepatitis B se insertó en el fago M13mp18 y se marcó con  $^{32}\text{P}$ dATP utilizando el protocolo de extensión en M13 (Collins y Hunsaker, 1985).

**Detección del gen de la DHFR.** El ADNc de la DHFR murina se marcó radioactivamente con  $^{32}\text{P}$ dATP utilizando la actividad de exonucleasa de la ADN polimerasa I fragmento Klenow según se describe en Alvarez *et al.* (1988).

**Detección de secuencias correspondientes al pBR 322:** Utilizando el protocolo de marcaje con seadores al azar (Feinberg y Vogetstein, 1984) se marcó el ADN de pBR 322 con  $^{32}\text{P}$ dATP.

En todos los casos la actividad específica de la sonda osciló entre  $1.5 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$  de ADN.

La expresión génica se estudió midiendo la síntesis de HBsAg en los diferentes cultivos celulares utilizando un ELISA específico (ICBPVG).

El número de copias de HBsAg y DHFR por genoma haploide se determinó por análisis de densitometría de los filmes de las hibridaciones realizadas por Southern. Para la cuantificación se incluyeron en los Southern 0.02, 0.2 y 1 ng de plasmidio pAd46 (Pérez *et al.*, 1988) equivalentes a 1, 10 y 50 copias/genoma haploide.

### Recuperación del ADN amplificado por transformación en bacteria

El ADN ( $5 \mu\text{g}$ ) de las líneas celulares parental y resistentes a 20 y 50 nM de metotrexato respectivamente, se digirió completamente con la enzima de restricción EcoRI (Enzibiot, Cuba). Después de la digestión, la reacción fue fenolizada, precipitada y diluida a 5 mg/ml en solución ADN T4 ligasa (20 mM Tris-HCl, pH 7.8; 20 mM DTT, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP). Se añadieron 2000 U de T4 ligasa (Enzibiot, Cuba) y se incubó por 12 horas a  $15^\circ\text{C}$ . Las reacciones se trataron con fenol:cloroformo (3:1), se precipitaron con etanol y se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* HB101.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Integración y amplificación génica

Para el análisis de la integración y amplificación génicas se escogieron tres líneas celulares seleccionadas en 0 nM (AD46), 20 nM (A8A4) y 50 nM (E1AB) de MTX (Pérez *et al.*, 1988). Un primer análisis de los ADN genómicos de estas líneas celulares mostró que la línea parental poseía alrededor de una copia de HBsAg por genoma haploide y que los clones amplificados presentaban entre dos y cuatro copias de HBsAg (Pérez *et al.*, 1988). Un análisis más minucioso nos permitió precisar que el clon seleccionado en 20 nM de MTX (A8A4) presenta seis copias de HBsAg por genoma haploide en tanto que el clon E1AB

presenta 10 copias (figura 1). De esta forma, en los primeros pasos de amplificación se logró aumentar el número de copias de HBsAg de seis a diez veces, comparado con la línea celular parental (AD46). Esta amplificación génica se refleja también en un aumento en la síntesis de HBsAg por estas líneas celulares (Pérez *et al.*, 1988).

Para el análisis por Southern se digirió el ADN cromosomal con la enzima de restricción EcoRI que digiere el plasmidio transfectado pAd46 en la unión de los genes VA con el vector, sin alterar la unidad básica

de transcripción AdMPLP-HBsAg-DHFR (Pérez *et al.*, 1988, figura 2).

Como se observa en la figura 1a, parece haber ocurrido un solo sitio de integración de la información transfectada en la línea celular parental. Sin embargo, después del primer paso de amplificación en 20 nM de MTX, aparecen dos fragmentos EcoRI de aproximadamente 5 kb y >50 kb que se amplifican por igual. Este resultado sugiere que durante el proceso de amplificación ocurrieron rearreglos dentro de la información transfectada.

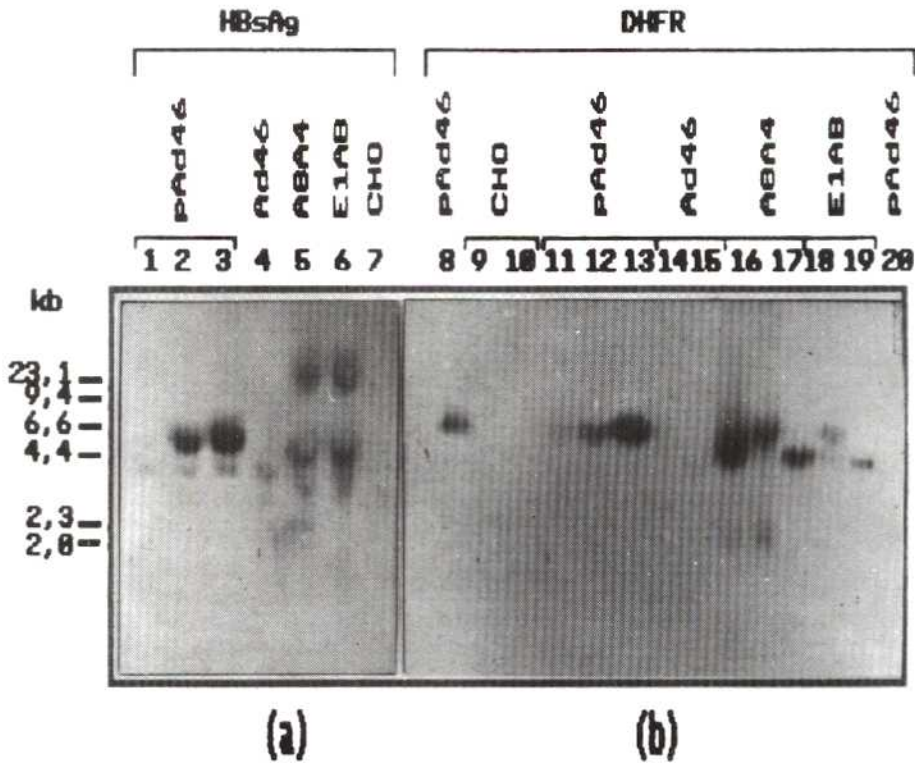


FIG. 1. Análisis por hibridación con Southern, de la línea celular parental y los clones resistentes a MTX. Se extrajo ADN de CHO, la línea celular parental AD46 y dos clones resistentes a 20 nM y 50 nM de MTX (A8A4 y E1AB respectivamente). Diez microgramos de ADN de cada línea celular se digirieron con la enzima de restricción EcoRI (líneas 4-7,9,14,16 y 18) o XbaI (líneas 10, 15,17 y 19) y se analizaron por hibridación mediante Southern como se describe en *Materiales y Métodos*. a) Hibridación con HBsAg, y b) Hibridación con DHFR. Las líneas 1-3 y 11-13 corresponden a 0,02; 0,2 y 1 ng de pAD46 más 10  $\mu$ g de ADN de CHO digeridos con EcoRI y equivalentes a 1, 10 y 50 copias del material transfectado/genoma haploide respectivamente. Aparece, además, el plasmidio pAD46 digerido con EcoRI (línea 8) y XbaI (línea 20). Las tallas de los fragmentos de  $\lambda$  digerido con HindIII utilizados como patrón de peso molecular están señaladas en kilobase.

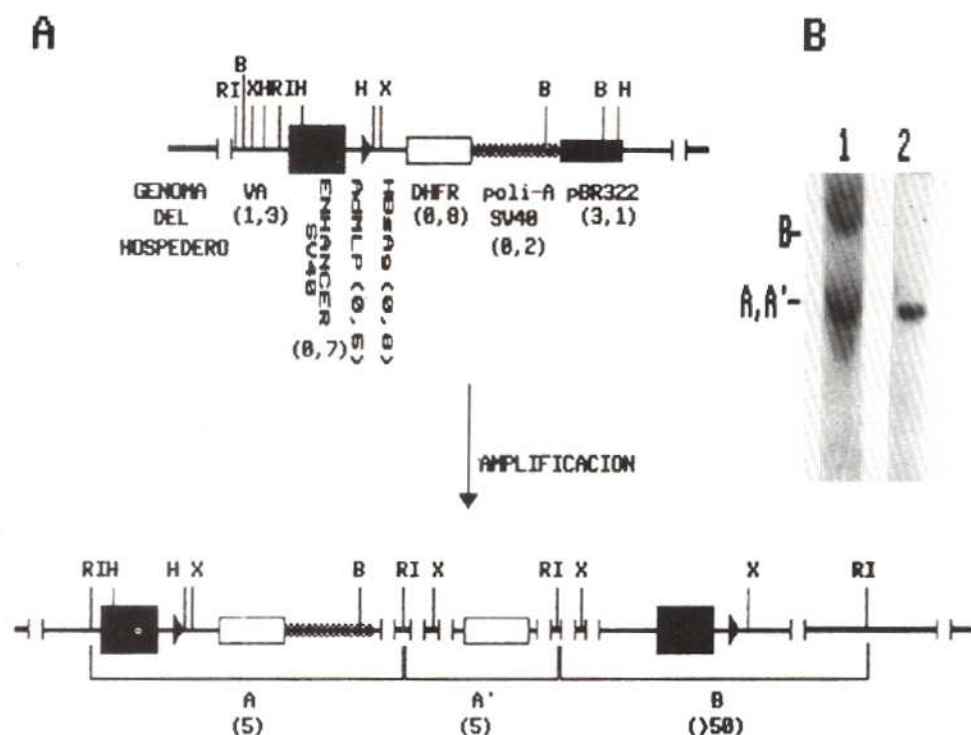


FIG. 2. Modelo de una posible estructura del amplicón. A. Posible estructura del fragmento integrado en el cromosoma celular en la línea parental AD46 y del amplicón en los clones seleccionados a 20 nM y 50 nM de MTX. Los elementos fundamentales del plasmidio transfectado están señalados (Pérez *et al.*, 1988).

Abreviaturas no señaladas en el texto: VA) genes asociados a virus del adenovirus 2 (Ad 2); AdMLP) promotor tardío del Ad 2; poli-A) señal de poliadenilación; RI) EcoRI; B) BamII; X) XbaI; H) HindIII. Entre paréntesis aparecen las tallas de estos elementos, en kilobase.

B. Fragmentos de los Southern de la figura 1 (líneas 6 y 18) correspondientes al clon E1AB, sólo para indicar la posición de los fragmentos EcoRI A, A' y B del amplicón.

Al analizar los ADN de estos clones para la presencia de secuencias de DHFR, se observa que aparece amplificada una sola banda de aproximadamente 5 kb (figura 1b). Este fragmento parece coincidir con la banda de 5 kb observada en el análisis para HBsAg (fragmento AA' en la figura 2) y debe contener la unidad de transcripción AdMLP-HBsAg-DHFR completa. No obstante, la presencia de un número más elevado de copias de DHFR en los clones amplificados A8A4 y E1AB (40 y 20 respectivamente, figura 1b, y Pérez *et al.*, 1988) en

comparación con las de HBsAg, hace pensar que los rearrreglos ocurridos durante el proceso de amplificación originaron la presencia de secuencias de DHFR divorciadas del gen del HBsAg y que pudieran ser o no funcionales. Este fenómeno pudiera explicar la obtención de clones resistentes a altas concentraciones de MTX sin un aumento considerable en los niveles de expresión de HBsAg (Pérez *et al.*, 1988).

El fragmento de > 50 kb que aparece en el Southern para el HBsAg y no en el hibridado con DHFR (fragmento B en

la figura 2), parece corresponder a secuencias de HBsAg que han perdido el gen del DHFR durante el proceso de amplificación. Sin embargo, el hecho de que se amplifiquen también, hace pensar que se encuentran formando parte de la misma unidad de amplificación (amplicón).

### Ausencia de fragmentos procariotas en el ADN amplificado

Para comprobar si durante los rearrreglos ocurridos en el proceso de amplificación se habían perdido o conservado las secuencias procariotas del material transfectado, se realizó un análisis de hibridación por Southern utilizando como sonda el pBR322. Como resultado de este experimento apareció que solo en la línea celular parental se detectaba la presencia de secuencias homólogas al pBR322 (resultados no mostrados). Esta evidencia sugiere que, como han reportado otros autores (Kaufman y Sharp, 1982) las secuencias procariotas pueden perderse durante el proceso de amplificación.

Se procedió entonces al rescate de fragmentos de ADN de la línea celular parental que contenían regiones procariotas, mediante la restricción del ADN cromosomal con EcoRI y la selección de colonias resistentes a tetraciclina como resultado de la ligadura y transformación en *E. coli* de la digestión. La enzima EcoRI digiere el ADN transfectado pAd46 originando fragmentos de 6,7 kb y 1,36 kb (figura 2, Pérez *et al.*, 1988). Como control en este experimento se realizó el mismo procedimiento con los ADNs de los clones amplificados y que no habían dado señal de hibridación en el Southern con pBR322.

Como resultado de la transformación se obtuvieron 76 colonias a partir del ADN de la línea celular parental y ninguna en las placas correspondientes a los clones ampli-

ficados. A una de estas colonias se le extrajo el plasmidio, se digirió con BamHI y HindIII y se analizó en un Southern utilizando como sonda el pBR322 (figura 3).

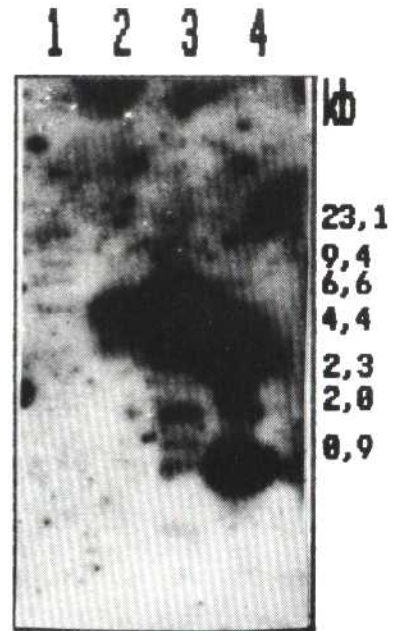


FIG. 3. Análisis por hibridación con Southern, de uno de los plasmidios extraídos de las colonias de *E. coli* recuperadas a partir del ADN de la línea parental. La recuperación del ADN celular por transformación en bacteria se realizó según se describe en *Materiales y Métodos*. Para el Southern, 10 ng de ADN se digirieron con HindIII (línea 1) o BamHI (línea 2). La hibridación se realizó según Southern, E. (1975) con la sonda de pBR 322 descrita en *Materiales y Métodos*. Las líneas 3 y 4 corresponden al plasmidio pAd46 digerido con HindIII y BamHI respectivamente. Las tallas señaladas (en kilobase) corresponden a los fragmentos del  $\lambda$  digeridos con HindIII y pBR 322 con AluI.

En la figura 3 se observa que los fragmentos que contienen secuencias homólogas al pBR322 son mayores en talla que los digeridos a partir del plasmidio pAd46. Este resultado señala hacia la existencia de fragmentos génicos del hospedero unidos

a las secuencias procariotas del ADN transfectedo, corroborando así la inserción en el genoma celular sin descartar la posibilidad de que hayan ocurrido algunos rearrreglos durante el proceso de transfección-integración (Kaufman y Sharp, 1982).

Finalmente, podemos concluir que, como ha sido reportado por otros autores (Kaufman y Sharp, 1982), ocurren frecuentes deleciones en las secuencias procariotas del material transfectedo. En las líneas celulares analizadas por nosotros, estas deleciones ocurrieron durante los rearrreglos originados por el proceso de amplificación.

### Estructura y evolución del amplicón

Los resultados expuestos en este trabajo no permiten analizar si la amplificación es consecuencia de un proceso de re-replicación o es el producto de algún mecanismo de recombinación. No obstante, pueden observarse rearrreglos durante el proceso de amplificación por cualquiera de estos mecanismos (como revisión reciente y para otras referencias, ver: Stark *et al.*, 1989).

Los rearrreglos descritos en este trabajo originan la reamplificación de algunas secuencias y la pérdida de otras. Como sugiere Carroll *et al.* (1988), fragmentos cromosomales amplificados pueden originar un elemento extracromosomal relativamente pequeño. Este elemento puede ser reamplificado e insertarse nuevamente en el cromosoma en el sitio original o en uno nuevo. La pérdida de fragmentos cromosomales puede ocurrir si una subregión del fragmento original es reamplificada y se mueve a otro cromosoma (Saito *et al.*, 1989).

En la figura 2 se muestra un modelo esquemático de la posible estructura de nuestro amplicón. Este modelo incluye las

deleciones observadas en el fragmento amplificado como resultado de los rearrreglos ocurridos durante el proceso de amplificación.

Sería necesario un estudio más profundo para poder conocer más detalladamente la estructura del amplicón en estas líneas celulares. Sin embargo, los resultados aquí expuestos evidencian los frecuentes rearrreglos y deleciones que acompañan a los procesos de amplificación en células de mamíferos, y las implicaciones prácticas que pueden tener estos mecanismos en la selección de clones productores de altos niveles de proteínas recombinantes.

### REFERENCIAS

- ALVAREZ, R.; P. RODRIGUEZ; J. DE LA FUENTE y L. HERRERA (1988). Expression of hepatitis B surface antigen by a recombinant vaccinia virus. *Interferón y Biotecnología* 5: 245-252.
- BIEDLER, J. L. y B. A. SPENGLER (1976). A novel chromosome abnormality in human neuroblastoma and antifolate-resistant Chinese hamster cells in culture. *J. Natl. Cancer Inst.* 57: 683-695.
- CARROLL, S. M.; M. L. DE ROSE; P. GANDRAY; C. M. MOORE; D. R. NEEDHAM-VANDEVANTER; D. D. VON HOFF y G. M. WAHL (1988). Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion. *Mol. Cell Biol.* 8: 1525-1533.
- COLLINS, M. L. y W. R. HUNSAKER (1985). Improved hybridization assays employing tailed oligonucleotide probes: A direct comparison with 5' end-labelled oligonucleotide probes and nick-translated plasmid probes. *Anal. Biochem.* 151: 211-224.
- FEINBERG, A. P. y B. VOGETSTEIN (1984). A technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Activity. *Addendum. Anal. Biochem.* 137: 266-267.
- GUILOTTO, E.; I. SAITO y G. R. STARK (1986). Structure of DNA formed in the first step of CAD gene amplification. *EMBO J.* 5: 2115-2121.

- HAMLIN, J. L.; J. D. MILBRANDT; N. H. HEINTZ y J. C. AZIZKHAN (1984). DNA sequence amplification in mammalian cells. *Int. Rev. Cytol.* 90: 31-82.
- KAUFMAN, R. J. y P. A. SHARP (1982). Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene. *J. Mol. Biol.* 159: 601-621.
- LOONEY, J. E. y J. L. HAMLIN (1987). Isolation of amplified dihydrofolate reductase domain from methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 569-577.
- MA, CH.; J. E. LOONEY; T-H. LEU y J. L. HAMLIN (1988). Organization and genesis of dihydrofolate reductase amplicons in the genome of methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2316-2327.
- MILBRANDT, J. D.; N. H. HEINTZ; W. C. WHITE; S. M. ROTHMAN y J. L. HAMLIN (1981). Methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells have amplified a 135 kilobase pair region that includes the dihydrofolate reductase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6043-6047.
- NUNBERG, J. H.; R. J. KAUFMAN; R. T. SCHIMKE; G. URLAUB y L. A. CHASIN (1978). Amplified dihydrofolate reductase genes are localized to a homogeneously staining region of a single chromosome in a methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5553-5556.
- PEREZ, A.; P. RODRIGUEZ; R. LLEONART; I. GUILLEN; L. HERNANDEZ; E. HERNANDEZ; C. SANTIZO; J. DE LA FUENTE y L. HERRERA (1988). Synthesis and secretion of the hepatitis B surface antigen in mammalian cells. *Interferón y Biotecnología* 5: 223-228.
- SAITO, I.; H. GROVES; M. ROLLO y G. R. STARK (1989). Evolution and stability of chromosomal DNA coamplified with the CAD gene. *Mol. Cell. Biol.* (en prensa).
- SCAHILL, S. L.; R. DEVOS; J. VANDER HEYDEN y W. FIERS (1983). Expression and characterization of the product of a human immune interferon cDNA in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4654-4658.
- SCHIMKE, R. T. (1984). Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* 37: 705-713.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- STARK, G. R. y G. M. WAHL (1984). Gene amplification. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 447-491.
- STARK, G. R.; M. DEBATISSE; E. GIULOTTO y G. M. WAHL (1989). Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 57: 901-908.
- WAHL, G. M.; L. VITTO; R. A. PADGETT y G. R. STARK (1982). Single copy and amplified CAD genes in Syrian hamster chromosomes localized by a highly sensitive method for in situ hybridization. *Mol. Cell. Biol.* 2: 308-319.