

Coamplificación del gen de la eritropoyetina humana en células de ovario de hámster chino *dhfr*⁻ resistentes a metotrexato

✉ Diana García del Barco, Alina Rodríguez, Elsa Rodríguez, Caridad Tamayo, Julio R Fernández, María M Vásquez, María P Rodríguez, Ricardo Leonart

División de Genética de Células de Mamíferos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, CP 10600, La Habana, Cuba. Telf: (53-7) 21 8164; Fax: (53-7) 33 6008; E-mail: diana.garcia@cigb.edu.cu

RESUMEN

Los procesos de amplificación génica desempeñan un papel importante en los mecanismos celulares de regulación. Para el estudio de la amplificación y expresión del gen de la eritropoyetina humana (EPO), se seleccionaron células de ovario de hámster chino (CHO) *dhfr*⁻ cotransfectadas con genes quiméricos para la expresión de la EPO y la dihidrofolato reductasa (DHFR), y que fueron seleccionadas en presencia de concentraciones crecientes de metotrexato. Los resultados evidenciaron una amplificación génica de tres veces, acompañada por un aumento en la expresión de la EPO hasta 33 pg/célula/día. El amplicón, que contiene secuencias genómicas del hospedero, muestra rearrreglos originados durante el proceso de integración-amplificación.

Palabras claves: amplificación génica, CHO, EPO, eritropoyetina

Biotecnología Aplicada 1999;16:232-235

ABSTRACT

Erythropoietin gene co-amplification in methotrexate-resistant Chinese hamster ovary *dhfr*⁻ cells. Gene amplification plays an important role in cellular regulatory mechanisms. To study the amplification and expression of the human erythropoietin (EPO) gene, Chinese hamster ovary (CHO) *dhfr*⁻ cells co-transfected with chimeric genes for the expression of EPO and dihydrofolate reductase (DHFR) and selected in the presence of increasing concentrations of methotrexate, were used. The results evidenced a three-fold gene amplification, accompanied by an increase in EPO expression of up to 33 pg/cell/day. The amplicon, which contains host genomic sequences, shows rearrangements originated during the integration-amplification process.

Keywords: CHO, EPO, erythropoietin, gene amplification

Introducción

La amplificación de genes de mamíferos desempeña un papel importante como mecanismo de regulación génica. En procesos neoplásicos, la amplificación génica ha sido asociada con la sobreexpresión de diferentes genes [1-6].

La amplificación génica ha sido empleada para la selección de clones altamente productores de proteínas recombinantes en células de mamíferos, como resultado del aumento paulatino de las concentraciones de agentes selectivos [7-13]. En células de ovario de hámster chino (CHO), los genes amplificados como el de la dihidrofolato reductasa (*dhfr*) se encuentran en una o más localizaciones cromosomales formando parte de amplicones que contienen grandes fragmentos génicos del hospedero [14-16].

Los mecanismos que gobiernan la amplificación génica parecen involucrar procesos de recombinación y replicación [2, 17]. Algunos autores proponen la formación, a partir de amplicones lineales, de círculos replicativos extracromosomales como vía para la amplificación [18]. No obstante, aún se desconoce mucho sobre los procesos de amplificación génica y la estructura de los amplicones. Su estudio es importante para la comprensión del papel que éstos desempeñan en los diferentes procesos celulares.

En este estudio se aborda la amplificación del gen de la eritropoyetina humana (EPO) cotransfectado con el ADNc del gen *dhfr* murino en células CHO *dhfr*⁻,

seleccionadas mediante el empleo de concentraciones crecientes de metotrexato (MTX).

Materiales y Métodos

Líneas celulares

Para la expresión del ADNc de la EPO [19] en células de mamíferos, se cotransfectaron los plasmidios pKepo y pSV2dhfr en proporción 9:1 en la línea celular CHO *dhfr*⁻ [20], mediante el procedimiento de precipitación de ADN con fosfato de calcio [16]. El plasmidio pKepo contiene el ADNc de la EPO bajo el control del promotor del virus SV40. El vector pSV2dhfr posee el gen de la dihidrofolato reductasa murina bajo el control de las secuencias reguladoras del SV40 [21].

Las células CHO *dhfr*⁻ fueron mantenidas en medio completo (mínimo esencial alfa con nucleósidos, suero fetal de ternero 10%, penicilina 100 U/mL, glutamina 2 mM y piruvato 2 mM a 37 °C en atmósfera de CO₂ 5%. Todos los componentes del medio fueron adquiridos de Gibco BRL, Estados Unidos. En fase exponencial de crecimiento, 7,5 x 10⁵ células fueron tratadas con tripsina y sembradas en placas de 60 mm (Nunc, Dinamarca). Veinticuatro horas más tarde estas células fueron transfectadas y 48 h después, tratadas con tripsina. La décima parte de la células transfectadas se sembró en medio de selección (mínimo esencial alfa sin nucleósidos, suero fetal de ternero dializado

1. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Cancer Detect Prev* 1998;22: 350-6.

2. Taylor C, Mai S. c-Myc-associated genomic instability of the dihydrofolate reductase locus in vivo. *Br J Cancer* 1998;77:2349-56.

3. Masramon L, Arribas R, Tortola S, Perucho M, Peinado MA. Moderate amplifications of the c-myc gene correlate with molecular and clinicopathological parameters in colorectal cancer. *Pathobiology* 1998;66:59-63.

4. Mark HF, Brown S, Sun CL, Samy M, Afify A. Fluorescent in situ hybridization detection of HER-2/neu gene amplification in rhabdomyosarcoma. *Gene* 1998;211: 101-8.

5. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, et al. A homologue of *Drosophila aurora* Kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Blood* 1998;92:234-40.

6. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, Parsa NZ, Cigudosa JC, Louie DC, et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247:57-9.

7. Kaufman RJ, Sharp PA. Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene. *J Mol Biol* 1982;159:601-21.

10%, penicilina 100U/mL, glutamina 2 mM y piruvato 2mM).

Las células escogidas por su capacidad de crecer en medio de selección, fueron mezcladas y seleccionadas paso a paso con concentraciones crecientes de MTX (20nM; 80nM; 400nM; 1,6 μ M y 6,4 μ M). Para incrementar las concentraciones de MTX, se verificó si las células adoptaron su morfología habitual y si el tiempo de doblaje fue igual al de las células parentales. Cada paso de la selección originó una mezcla de células con capacidad para crecer frente a dicha concentración de MTX. Este conjunto policlonal de células fue identificado con el nombre de la mezcla inicial de células después de la selección en medio selectivo (DA/24), seguido del valor de la concentración de MTX a la cual fue seleccionado.

Con la línea policlonal resistente a MTX 6,4 μ M (DA/24 6.4), se practicó el método de dilución limitante con el objetivo de aislar células independientes y establecer una línea de origen clonal (M29).

Análisis de la expresión de la EPO

Para las cosechas, un millón de células fue sembrado en frascos de 25 cm² (Nunc, Dinamarca) en 5mL de medio completo. Los sobrenadantes de las líneas celulares DA/24, DA/24 6.4 y M29, fueron colectados 24 h más tarde y fueron ensayados con un sistema ELISA comercial para determinar EPO en sangre humana (Boehringer Mannheim, Alemania). A la vez, se hicieron determinaciones de la actividad biológica *in vivo* a través del ensayo en ratones hipóxicos [22], e *in vitro* mediante el empleo del método descrito por Krystal en 1983 [19,23].

Para el análisis de los transcritos de la EPO en las diferentes líneas celulares, se realizó un ensayo de Northern blot según se ha descrito previamente [24]. Se empleó como sonda el ADNc de la EPO obtenido mediante digestión *EcoRI-HindIII* del plásmido pKepo, marcado radiativamente con ³²P según el procedimiento descrito por Feinberg y Voetstein [25].

Análisis del ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó mediante el procedimiento descrito por Ross y Nelson [26]. Para la determinación del número de copias del gen de la EPO por genoma celular, se realizó un Southern blot en el cual se aplicaron muestras de plásmido pKepo equivalentes a 1,50 y 100 copias del gen de la EPO por genoma celular. Se normalizaron las señales mediante rehibridación con una sonda de β -actina de ratón. En las digestiones con enzimas de restricción (New England Biolabs, Estados Unidos), se emplearon 20 μ g de ADN y se siguieron las recomendaciones del fabricante. El análisis por Southern blot se realizó según se ha descrito previamente [19]. En las hibridaciones se usaron diferentes sondas. Para la detección del gen de la EPO se usó su ADNc, mientras que para la detección del gen de resistencia a ampicilina (*amp*) se utilizó un fragmento de 364 pb de este gen, obtenido mediante digestión *ScaI-BglI* del plásmido pUC19. En todos los casos el marcaje radiactivo se realizó según lo descrito anteriormente para el Northern blot. Los lavados finales se realizaron con fosfato de sodio 40mM, SDS 1%, pH 7,2, durante 30 min a 65°C.

Resultados y Discusión

Expresión del gen de la EPO en células CHO *dhfr*⁻

Después de la cotransfección de los plásmidos pKepo y pSV2dhfr en proporción 9:1 en la línea celular CHO *dhfr*⁻, se obtuvieron 46 clones, lo que representa una frecuencia de transfección de 6,4x10⁻⁵. Este valor de frecuencia es similar al obtenido por otros autores [7,8,13].

A medida que se seleccionaban células resistentes a concentraciones crecientes de MTX, la producción de EPO aumentaba hasta que alcanzó el valor de 33 pg/célula/día (Tabla). En el clon M29 la expresión resultó ser de 25 \pm 5pg/célula/día. El hecho de que el clon M29 tuvo niveles de EPO menores que la línea DA/24 6.4, responde a que el primero es una población clonal obtenida de la mezcla heterogénea que compone la línea DA/24 6.4, donde hay poblaciones celulares con diferentes niveles de expresión. La EPO secretada al medio de cultivo poseía una actividad biológica de 100000 \pm 7 000U/mg (N = 3) *in vitro* y mayor de 120000U/mg *in vivo*.

Integración y amplificación génica

Para el análisis de la integración y amplificación génicas, se escogieron las líneas celulares DA/24, DA/24 6.4 y M29, seleccionadas en 0, 6,4 y 6,4 μ M (clonal) de MTX, respectivamente. Estas líneas contenían 20, 40 y 60 copias del gen quimérico de la EPO por genoma celular, lo que evidenció una amplificación génica de tres veces (Figura 1). Esta amplificación génica se reflejó

Tabla. Amplificación génica y expresión de la EPO.

Líneas celulares ¹	Número de copias / genoma	Expresión (pg/célula/día)	Actividad biológica <i>in vivo</i> ²
DA/24	20	10 (N = 1)	> 100 000 U/mg
DA/24 6.4	40	33 (N = 1)	> 100 000 U/mg
M29	60	25 \pm 5 (N = 6)	> 120 000 U/mg

¹Las líneas celulares DA/24, DA/24 6.4 y M29 se seleccionaron en 0; 6,4 y 6,4 μ M (clonal) de MTX, respectivamente.

²Las determinaciones se realizaron a través del ensayo en ratones policitémicos [22].

N: número de determinaciones.

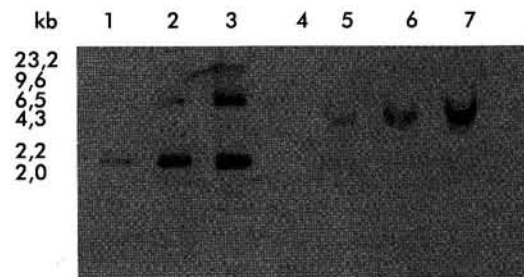


Figura 1. Análisis por Southern blot de la amplificación del gen de la EPO en las líneas celulares DA/24 (carrilera 5), DA/24 6.4 (carrilera 6) y M29 (carrilera 7), las cuales fueron seleccionadas en 0; 6,4 y 6,4 μ M (clonal) de MTX, respectivamente. Veinte microgramos de ADN genómico digeridos con *EcoRI* fueron empleados en el análisis. Para la determinación del número de copias del gen de la EPO por genoma celular, se aplicaron muestras del plásmido pKepo equivalentes a 1, 50 y 100 copias del gen de la EPO por genoma celular (carrileras 1-3). Para la hibridación se usó el ADNc de la EPO obtenido por digestión *EcoRI-HindIII* del plásmido pKepo. Las señales fueron normalizadas mediante la rehibridación con una sonda de β -actina de ratón.

8. Scallil SL, Devos R, Vander Heyden J, Fiers W. Expression and characterization of the product of human immune interferon cDNA in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:4654-8.

9. Hamlin JL, Milbrandt JD, Heintz NH, Azickhan JC. DNA sequence amplification in mammalian cells. *Int Rev Cytol* 1984;90:31-82.

10. Stark GR, Wahl GM. Gene amplification. *Ann Rev Biochem* 1984;53:447-91.

11. Schimke RT. Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* 1984;37:705-13.

12. Pérez A, Rodríguez P, Leonart R, Guillén I, Hernández L, Hernández E, et al. Synthesis and secretion of the hepatitis B surface antigen in mammalian cells. *Interferon y Biotecnología* 1988;5:223-8.

13. Leonart R, Rodríguez P, Guillén I, Hernández L, Álvarez R, Pedraza A, et al. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in eukaryotic cells. *Biotecnología Aplicada* 1991;8:156-65.

14. Milbrandt JD, Heintz NH, White WC, Rothman SM, Hamlin JL. Methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells have amplified a 135 kilobase pair region that includes the dihydrofolate reductase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:6043-7.

15. Ma CH, Looney JE, Leu T-H, Hamlin JL. Organization and genesis of dihydrofolate reductase amplicons in the genome of methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Mol Cell Biol* 1988;8:2316-27.

16. Pérez A, Rodríguez P, Hernández L, de la Fuente J, Herrera L. Rearreglos cromosomales en la amplificación del gen quimérico del antígeno de superficie de la hepatitis B-dihydrofolato reductasa de ratón en células de ovario de hamster chino. *Biotecnología Aplicada* 1990;7:265-71.

17. Khaira P, James CD, Lefkoff M. Amplification of the translocated c-myc genes in three Burkitt Lymphoma cell lines. *EMBO J* 1998;211:3052-65.

18. Grondin K, Kundig C, Roy G, Ouellette M. Linear amplicons as precursors of amplified circles in methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae*. *J Biomed Sci* 1998;5:101-10.

19. Rodríguez A, Castro FO, Aguilar A, Ramos B, García del Barco D, Leonart R, et al. Expression of active human erythropoietin in the mammary gland of lactating transgenic mice and rabbits. *Biological Research* 1995;28:141-53.

20. Urlaub L, Chasin A. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4216-20.

21. Pauwels PH, Enger Valk BE, Brannan WJ. Cloning vectors: a laboratory manual. Amsterdam: Elsevier; 1985. p.VIII B b-i-4.

22. Mari Cote P, Vanhan R. Bio-assay erythropoietin in mice make polycitemic by exposure to air and a reduced pressure. *Nature* 1961;191(4793):1065-7.

también en un aumento de la síntesis de EPO por estas líneas celulares (Tabla). Aunque la amplificación obtenida fue relativamente baja, permitió la selección de clones estables con alta producción de EPO. El clon M29 fue mantenido durante más de 90 generaciones en ausencia de MTX con los mismos niveles de EPO (en condiciones de producción en frascos de rotación, diferentes a las ensayadas en el laboratorio, los niveles mantienen en 11 ± 2 pg/célula/día; N = 10). La continuación del proceso de selección en MTX pudiera permitir la identificación de clones con una mayor amplificación, pero se pudiera correr el riesgo de que éstos fueran inestables una vez retirado el agente selectivo del medio de cultivo. Amplificaciones similares han sido reportadas por otros autores [7, 8, 12, 13, 27].

El análisis por Southern blot del ADN de la línea celular M29, indicó que el fragmento integrado en el genoma del hospedero había perdido la región correspondiente al gen de resistencia a la ampicilina (Figura 2). Este resultado sugiere que la formación de concatámeros cabeza-cola en el fragmento integrado ocurrió a través de un proceso de recombinación homóloga en la región que incluye al gen *amp* (Figura 3). Otros autores también han reportado la pérdida de secuencias de origen procariota durante el proceso de integración-amplificación [7, 16].

Según se observa en la Figura 4, parece que hubo un solo sitio de integración del gen quimérico de la EPO en el genoma celular. Si hubo más de un sitio de integración, sólo uno de ellos fue coamplificado durante el proceso de selección. Sin embargo, después del proceso de selección, el amplicón contenía, además, un fragmento que comprende parte del promotor del virus SV40 y el ADNc de la EPO (Figuras 3 y 4). Este rearreglo debió originarse después de la integración durante el proceso de amplificación y puede ser funcional o no a nivel transcripcional. El análisis por Northern blot de los transcritos de la EPO (Figura 5) evidencia la existencia de dos transcritos: uno de aproximadamente 3,0 kb, y otro de menor talla ($\approx 1,0$ kb) que podría corresponder al producto de transcripción del fragmento rearreglado.

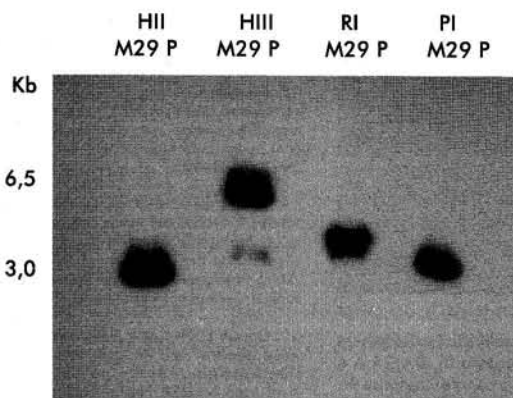


Figura 2. Análisis por Southern blot de la región *amp* en el amplicón. En los tratamientos con enzimas de restricción se emplearon 20 µg de ADN cromosomal del clon M29 y 1 ng del plasmidio pKepo (P). Para las hibridaciones se empleó como sonda un fragmento de 364 pb del gen *amp*, obtenido mediante digestión *ScaI*-*BglI* del plasmidio pUC19. HII, *HincII*; HIII, *HindIII*; RI, *EcoRI*; PI, *PstI*.

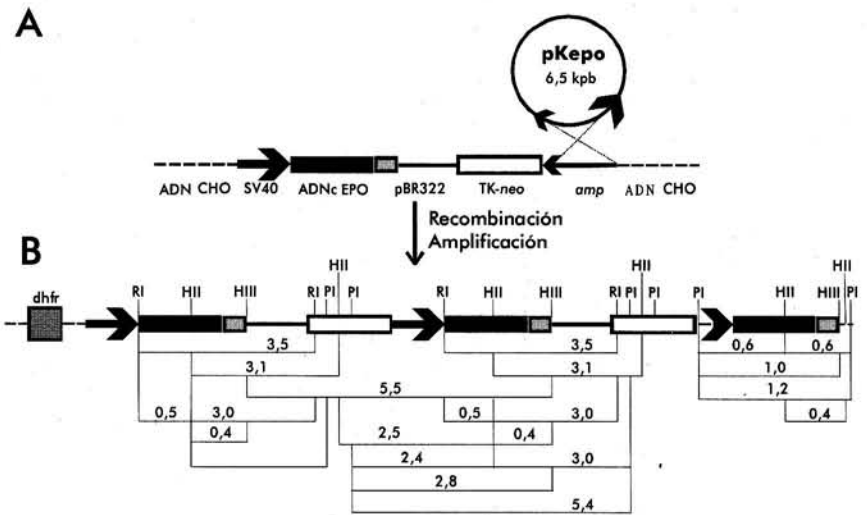


Figura 3. Génesis y estructura del amplicón. (A) Después de una integración simple del plasmidio pKepo transfectado, parece haber ocurrido una recombinación homóloga en la región *amp*. (B) De esta forma, se origina la estructura cabeza-cola del amplicón, que se rearregla posteriormente con independencia o no del gen de la DHFR murina. Se indican, en kpb, las tallas de los fragmentos originados con las digestiones con las enzimas *HincII* (HII), *HindIII* (HIII), *EcoRI* (RI) y *PstI* (PI). TK, promotor del gen de la timidina quinasa del virus herpes simple; neo, gen de resistencia a neomicina.

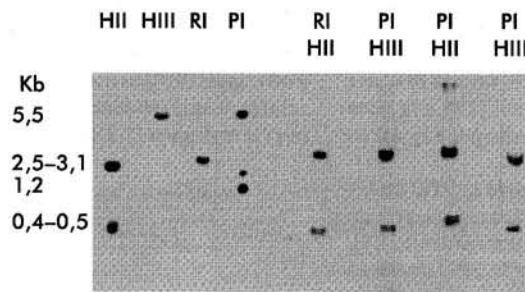


Figura 4. Análisis por Southern blot del amplicón que contiene el gen de la EPO. En los tratamientos con enzimas de restricción se emplearon 20 µg de ADN cromosomal del clon M29. Para las hibridaciones se empleó como sonda el ADNc de la EPO obtenido por digestión *EcoRI*-*HindIII* del plasmidio pKepo. HII, *HincII*; HIII, *HindIII*; RI, *EcoRI*; PI, *PstI*.

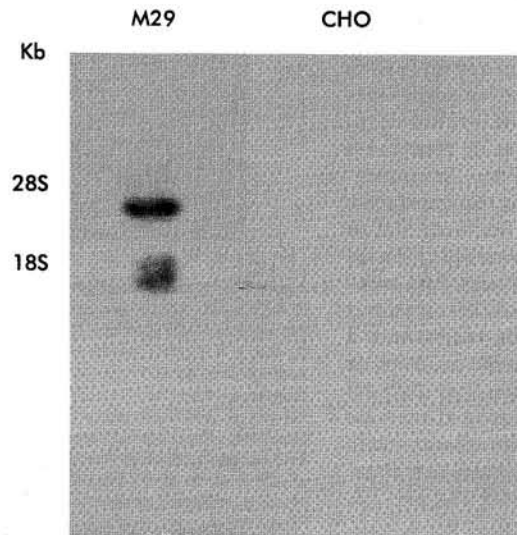


Figura 5. Análisis por Northern blot de la expresión del gen de la EPO. Se emplearon 10 µg de ARN total del clon M29 y de células CHO *dhfr*⁻ (control negativo), y se realizó la hibridación con la sonda de EPO descrita en la Figura 3.

Para la construcción de estas líneas celulares, el gen quimérico que contiene el ADNc de la DHFR murina fue cotransfectado con el plasmidio pKepo. Por consiguiente, aunque el gen *dhfr* forme parte del amplicón, se encuentra integrado en un sitio diferente, separado del gen de la EPO por secuencias del hospedero que estarían atrapadas en el amplicón (Figura 3B). Sin embargo, como se ha evidenciado en otros casos [16], puede existir un segundo amplicón que contenga solamente el gen quimérico de la DHFR y que sea el responsable de la existencia de clones con gran resistencia a MTX y con bajos niveles de EPO. Este último mecanismo pudiera explicar también la presencia de 20 copias por genoma del gen de la EPO en la línea celular DA/24, transfectada antes de la selección con MTX (Figura 1 y Tabla).

Los rearrreglos durante el proceso de integración-amplificación reportados en este trabajo, parecen ser frecuentes en la obtención de líneas celulares de mamíferos con altos niveles de expresión de proteínas recombinantes y en otros procesos celulares [2,7,16,28].

Aunque este trabajo no pretende abordar los mecanismos que gobiernan el proceso de amplificación génica en células de mamíferos, los resultados obtenidos apoyan el modelo de amplificación de círculos extracromosomales formados a partir de amplicones lineales [18]. Este modelo al menos permite explicar por qué la

gran mayoría de las copias del gen quimérico de la EPO contenidas en el amplicón carece de la región *amp*. Además, la ausencia de fragmentos de alto peso molecular (mayores de 6 kbp) después de la digestión con *HincII* o *HindIII* (Figura 4), puede explicarse por diferencia en el número de copias existente entre los fragmentos detectados en el Southern blot (amplificados) y los extremos del inserto que se encuentran presente en una o pocas copias. Este resultado también es congruente con el mecanismo de amplificación de círculos extracromosomales.

Los resultados de este trabajo ejemplifican cómo se estructuran los amplicones en células CHO *dhfr*⁻ cotransfectadas con construcciones que contienen el gen *dhfr* y genes quiméricos para la producción de proteínas recombinantes a niveles elevados después de la selección de clones resistentes a altas concentraciones de MTX. Esta información puede contribuir a la estructuración de los procesos de amplificación para lograr clones celulares estables y capaces de producir proteínas recombinantes a altos niveles después de la eliminación del agente selectivo.

Agradecimientos

Se agradece la ayuda técnica prestada por Amílcar Arenal y Alina Aguirre, de la División de Genética de Células de Mamíferos en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba.

23. Krystal GA. Simple microassay for erythropoietin based on H³-thymidine incorporation into spleen cells from phenylhydrazine treated mice. *Exp Hematol* 1983;11:649-60.

24. López-Ocejo O, Herrera A, Herrera L, de la Fuente J. Expression of interferons- alpha and beta, tumor necrosis factor-alpha and transcription factors, IRF-1 and IRF-2, in leukocytes induced during interferon production. *Biol Res* 1995;28:283-90.

25. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high activity. (Addendum). *Anal Biochem* 1984; 137:266-7.

26. Ross JA, Nelson GB. DNA isolation from small tissue samples using salt and spermidine. *Nucl Acids Res* 1991;21:6053.

27. Herrera L, de la Fuente J, Quiñones Y. Biologicals production by recombinant DNA technology in Cuba. *Develop Biol Standar* 1989;70:257-69.

28. Stark GR, Debatisse M, Giulotto E, Wahl GM. Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 1989;57:901-8.

Recibido en diciembre de 1998. Aprobado en junio de 1999.