



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



UNIVERSIDAD
DE CHILE

**Desarrollo de un promotor resistente al silenciamiento génico e
inducible para la producción de anticuerpos recombinantes en
células de ovario de hamster chino**

Roberto Aquiles Zúñiga Olate

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de Doctor

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República, UdelaR

Noviembre 2022

**Desarrollo de un promotor resistente al silenciamiento génico e
inducible para la producción de anticuerpos recombinantes en
células de ovario de hamster chino**

Tribunal:

Dr. Gualberto Gerardo González Sapienza
Presidente del tribunal

Dra. Mariela Raquel Bollati Fogolín
Integrante del tribunal

Dr. José Alejandro Chabalgoity Rodríguez
Integrante del tribunal

Dra. María Carmen Molina Sampayo
Directora

Dra. Iris Miraballes Martínez
Directora

Agradecimientos

1. A mi tutora

“María Carmen Molina, *PhD*. Por haber creído en mi y apoyarme para ingresar a este programa doctoral. Además de la guía y consejos en el desarrollo de este trabajo de tesis. Pero principalmente por la su animo perseverante en momentos en que estubo en riesgo la culminacion de esta tesis. Sin lugar a duda su apoyo constante fueron escenciales para llenarme de confianza y culminar este trabajo. Gracias por su orientación y la amistad forjada durante estos años”

2. A mis familia

“Mis padres, Lautaro y Dalila, quienes con su amor fueron el motor que impulsó mis sueños y esperanzas, motivandome para encontrar mi propio camino en la vida. Se que hubiesen estados orgullosos de ver este logro en mi vida”.

“A Mappi, mi esposa, Tania y Camilo, mis hijos, por su paciencia, abnegación y ánimo para seguir adelante, quienes se son justamente participe de este logro. Por lo cual esta tesis esta dedicada a ustedes.... Mi amada familia”.

3. A mis compañeros

“Mis compañeros, con quienes compartí maravillosos momentos tanto en el laboratorio, congresos y salidas fuera del trabajo que permitieron forjar amistades que se han mantenido en el tiempo. Con temos de olvidar alguno agresco a Matias, Norberto, Pablo, Patricia, Juanita, Lorenzo, Jaime, Nancy.”

Desarrollo de un promotor resistente al silenciamiento génico e inducible para la producción de anticuerpos recombinantes en células de ovario de hamster chino

Mag. Roberto Aquiles Zúñiga Olate

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química
Universidad de la República. UdelaR.

2022

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María Carmen Molina.

Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias,
Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile,
Santiago, Chile.

DIRECTORA ACADEMICA:

Dra. Iris Miraballes Martínez.

Inmunología Clínica Dpto. BIOCLIN

BIOTECNOLOGIA -IPTP

Facultad de Química,

Universidad de la República, UdelaR,

Montevideo, Uruguay.

Resumen

La producción de anticuerpos recombinantes es una de las áreas más importantes en la industria biofarmacéutica siendo el promotor de la transcripción de citomegalovirus (promotor CMV) el más utilizado para expresarlos en líneas celulares de mamíferos y su uso radica en que es un promotor fuerte. Sin embargo, este promotor es susceptible de ser silenciado, lo que limita la productividad de proteínas recombinantes. Algunas islas CpG pueden evitar el silenciamiento genético de los genes de expresión constitutiva (*housekeeping*), por esa razón se han utilizado para disminuir el silenciamiento de los genes recombinantes en células de origen animal.

En este trabajo se analizó la utilidad de la isla CpG de la región promotora del gen de β actina (*ACTB*) de *Cricetulus griseous* para reducción del silenciamiento del promotor CMV y generar un nuevo promotor más resistente al silenciamiento. Para ello, utilizamos la región no codificante de la isla CpG, a la que denominamos RegCG, observando mediante ensayos de transcripción transientes y estables que se comporta como un promotor en células CHO-K1, siendo más resistente al silenciamiento que el promotor CMV. También, se comprobó que la combinación RegCG y CMV para formar promotores híbridos genera promotores más resistentes al silenciamiento que los promotores CMV y RegCG por separado, pudiendo mantener la expresión de anticuerpos recombinantes en clones estables luego de 40 días de cultivo sin presión selectiva a un nivel promedio 4 veces más alto que el promotor de CMV. Este promotor híbrido demostró ser compatible con el sistema de amplificación genética por inducción con metotrexato en células de ovario de Hámster chino (CHO) deficientes en el gen *dihidrofolato reductasa* (*DHFR*), que junto a una estrategia de enriquecimiento de poblaciones productoras basada en FACS permitió obtener clones productores de anticuerpos con productividad específica de 2,7 pg/célula/día en condiciones de cultivo no optimizadas.

Adicionalmente, al promotor híbrido se asoció con elementos de respuesta a hormonas esteroidales para probar la capacidad de generar un promotor inducible a partir del promotor CMV. La adición de un tándem de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) entre RegCG y CMV resultó en la generación de un promotor que fue capaz de responder a la inducción en presencia de su ligando (dexametasona) en algunos clones de células CHO-K1 que contienen este

promotor, asumiendo que las condiciones de inducción pueden ser variables para cada clon y las que deben ser estudiadas caso a caso.

En síntesis, en el contexto de esta tesis se construyó un promotor híbrido entre RegCG, un tándem de GREs y CMV que permitió obtener clones productores de anticuerpos recombinantes con menor silenciamiento transcripcional que el promotor CMV y obtener clones de alta producción de anticuerpo demostrando que este promotor podría ser una buena alternativa para la generación de clones para aplicaciones industriales.

Este trabajo conto con el financiamiento de los proyectos Anillo ACT-210068 y Fondecyt regular 1221031 de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), Chile.

Title

**Development of a promoter resistant to gene silencing and inducible for the
production of recombinant antibodies in Chinese hamster ovary cells**

Mag. Roberto Aquiles Zúñiga Olate

Graduate Program in Chemistry,

Facultad de Química, Universidad de la República

2022

DIRECTOR:

María Carmen Molina Sampayo

Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias,
Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile,
Santiago, Chile.

Abstract

The production of recombinant antibodies is one of the most important areas in the biopharmaceutical industry, with the cytomegalovirus transcription promoter (CMV promoter) being the most used to express them in mammalian cell lines and its use is that it is a strong promoter. However, this promoter is susceptible to being silenced, which limits the productivity of recombinant proteins. Some CpG islands can prevent genetic silencing of *housekeeping* genes, which is why they have been used to decrease the silencing of recombinant genes in cells of animal origin.

This work analyzed the usefulness of the CpG island of the promoter region of the *actin β* gene (*ACTB*) of *Cricetulus griseous* to reduce the silencing of the CMV promoter and generate a new promoter more resistant to silencing. To do this, we used the non-coding region of the Island CpG, which we call RegCG, observing through transient and stable transcription assays that it behaves as a promoter in CHO-K1 cells, being more resistant to silencing than the CMV promoter. Also, it was found that the combination of RegCG and CMV to form hybrid promoters generates promoters more resistant to silencing than CMV and RegCG promoters separately, being able to maintain the expression of recombinant antibodies in stable clones after 40 days of culture without pressure selective at an average level 4 times higher than that of the CMV promoter. This hybrid promoter was shown to be compatible with the genetic amplification system by induction with methotrexate in Chinese Hamster ovary cells (CHO) deficient in the *dihydrofolate reductase* (*DHFR*) gene, which together with a strategy of enrichment of producing populations based on FACS allowed to obtain antibody producing clones with specific productivity of 2 pg/cell/day under non-optimized culture conditions.

Additionally, the hybrid promoter was associated with steroidal hormone response elements to test the ability to generate an inducible promoter from the CMV promoter. The addition of a tandem of glucocorticoid response elements (GRE) between RegCG and CMV resulted in the generation of a promoter that was able to respond to induction in the presence of its ligand (dexamethasone) in some CHO-K1 cell clones containing this promoter, assuming that the induction conditions may be variable for each clone and those that must be studied on a case-by-case basis.

In summary, in the context of this thesis, a hybrid promoter was built between RegCG, a tandem of GREs and CMV that allowed to obtain recombinant antibody producing clones with

less transcriptional silencing than the CMV promoter and to obtain clones of high antibody production demonstrating that this promoter could be a good alternative for the generation of clones for industrial applications.

This work was financed by the projects Anillo ACT-210068 and Fondecyt regular 1221031 of the National Research and Development Agency (ANID), Chile.

Indice

Resumen	viii
Abstract	xi
Indice.....	xiii
Lista de Figuras	xv
Lista de Tablas	xvi
Lista de abreviaturas.....	xvii
Introducción	1
Producción de AcRs en células de origen animal.....	3
Células de Ovario de Hámster Chino	4
Promotores de la transcripción de genes recombinantes.....	4
Mecanismos de silenciamiento de promotores.....	7
Las islas CpG disminuyen el silenciamiento transcripcional de los promotores recombinantes.....	8
Promotores inducibles	122
Racional.....	14
Hipótesis.....	16
Objetivos:	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	16
Materiales y métodos	18
Aislamiento de ADN y PCR.....	18
Cultivo celular y medios.	18
Diseño y construcción de promotores y plásmidos.	18
Transfección de células CHO K1 adherentes	23
Ensayos de reportero transcripcional.....	23
Generación de líneas celulares anti-CD20 humano productoras de anticuerpos	24
Generación de líneas celulares que producen anticuerpos anti-TNF humanos.....	24
Determinación de la producción de anticuerpos (ELISA)	25
Análisis de la expresión génica por RT-PCR	25
Análisis estadístico.....	26
Resultados	26

OE1.- Construir un promotor híbrido entre promotor CMV, una isla CpG y elementos de respuesta a hormonas esteroidales	26
A1.1: Identificando y analizando bioinformáticamente una isla CpG asociada al promotor de un gen <i>housekeeping</i> en el genoma de células CHO	26
A1.2: Diseñando la construcción de un promotor resistente al silenciamiento e inducible en respuesta a hormonas esteroidales	30
A1.3: Evaluando <i>in vitro</i> la actividad del promotor híbrido.....	31
8OE2. Generar un promotor inducible por hormonas esteroidales.....	38
A2.1 Analizando la actividad del promotor híbrido con GRE en un sistema reportero de la transcripción	38
A2.2 Analizando la actividad del promotor híbrido con GRE en un sistema de expresión de anticuerpos recombinantes.	39
OE3. Generar un promotor resistente al silenciamiento génico.....	43
A3.1: Evaluando el silenciamiento génico en un sistema reportero de la actividad transcripcional de líneas estables bajo el control de promotores híbridos	43
A3.2: Evaluando el decaimiento de la producción de anticuerpos recombinantes de líneas estables bajo el control de promotores híbridos	44
A3.3 Evaluando la capacidad de generar clones estables de alta producción con el promotor híbrido.....	46
Discusión	52
La isla de CpG	52
Silenciamiento de promotores híbridos	54
Promotor Inducible.....	57
Conclusiones	60
Referencias	61
Anexo	74

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura de un anticuerpo.....	1
Figura 2. Representación esquemática de un Promotor.....	5
Figura 3. Decaimiento de la actividad del promotor CMV en cultivos estables.....	7
Figura 4. Asociación de un UCOE con promotor CMV aumenta la frecuencia de clones de alta producción.	11
Figura 5. Activación de receptores esteroidales.	14
Figura 6. Esquema de la construcción de promotores y vector.....	21
Figura 8. Alineamiento de secuencias promotoras de genes de β actina.	28
Figura 9. Isla CpG del promotor de β actina.	29
Figura 10. Análisis de actividad de promotores en ensayos de expresión transiente.....	34
Figura 11. Efecto de un tándem de Elementos de Respuesta a Hormonas Esteroidales en la actividad del promotor CMV mediante transfección transiente.	35
Figura 12. El promotor RegCG tiene un sitio de inicio de transcripción en el primer intrón.	37
Figura 13. Análisis de la inducción por dexametasona de clones estables con promotores que poseen GRE	40
Figura 14. Clones estables con vector pRegCG/GRE/CMV-aCD20HL son sensibles a dexametasona.. ..	42
Figura 15. Los promotores que contienen RegCG son resistentes al silenciamiento en líneas celulares estables.....	45
Figura 16. Los promotores que contienen RegCG aumentan los niveles de producción de un anticuerpo anti-CD20 en células CHO-K1	47
Figura 17. Estrategia de selección de poblaciones celulares de células CHO-DG44, transfectadas con genes codificantes de un anticuerpo anti-TNF humano	48
Figura 18. Selección de clones de células CHO-DG44 transfectadas con genes codificantes de un anticuerpo anti- α TNF.....	50
Figura 19. Producción de un anticuerpo recombinante en células CHO DG44 con un promotor que contiene RegCG	51

Lista de Tablas

Tabla 1. Lista de Cebadores.....	22
----------------------------------	----

Lista de abreviaturas

AcM:	anticuerpo monoclonal
AcR:	anticuerpo recombinante
AcT:	anticuerpo terapéutico
ACTB:	beta actina, del inglés <i>actin beta</i>
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN complementario
ANOVA:	análisis de varianza, del inglés <i>analysis of variance</i>
ARN:	ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
BSA:	albúmina de suero bovino, del inglés <i>bovine serum albumin</i>
CHO:	ovario de hamster chino del inglés, <i>chinese hamster ovary</i>
CMV:	citomegalovirus
CpG:	dinucleótidos citosina-guanina
DHFR:	dihidrofolato reductasa
ELISA:	ensayo inmunoabsorbente asociado a enzima, del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMBL:	European Molecular Biology Laboratory, del inglés <i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EMBL-EBI:	Instituto Europeo de Bioinformática del EMBL, del inglés <i>EMBL's European Bioinformatics Institute</i>
ERE:	elemento de respuesta a estrógeno, del inglés <i>estrogen response element</i>
FACS:	separación de células activadas por fluorescencia, del inglés <i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FSC:	dispersión directa, del inglés <i>forward scattering centroid</i>
GC:	guaninas y citosinas
GRE:	elementos de respuesta a glucocorticoides, del inglés <i>glucocorticoid response element</i>
HAMA:	Anticuerpos humanos anti-ratón, del inglés <i>Human Anti-Mouse Antibodies</i>

HRP:	peroxidase de rábano, del inglés <i>horseradish peroxidase</i>
NCBI:	Centro Nacional de Información Biotecnológica , del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>
pb:	pares de base
PBS:	buffer fosfato salino, del inglés <i>phosphate-buffered saline</i>
PBST:	PBS con tween20, del inglés, <i>phosphate buffered saline / Tween20</i>
PCR:	reacción de la polimerasa en cadena, del inglés, <i>polymerase chain reaction</i>
qPCR:	PCR cuantitativo, del inglés <i>quantitative PCR</i>
URL:	unidad relativa de luminiscencia
RT:	transcriptasa inversa, del inglés <i>reverse transcriptase</i>
S/MAR:	regiones asociadas a andamio/matriz, del inglés <i>scaffold/matrix-associated regions</i>
SSC:	dispersión lateral, del inglés, <i>statistic scattering centroid</i>
TMB:	3,3',5,5'-tetrametilbencidina, del inglés <i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i>
TSS:	sitio de inicio de la transcripcion, del inglés <i>transcription start site</i>
UCOE:	elemento de apertura de cromatina ubicua, del inglés <i>ubiquitous chromatin opening element</i>
URL:	unidades relativas de luminiscencia
UTR:	región no transcrita, del inglés <i>untranslated region</i>

Introducción

Los biofármacos han emergido como la nueva generación de moléculas terapéuticas en la industria farmacéutica y se refieren a “productos medicinales, terapéuticos, profilácticos, o de diagnóstico *in vivo*, cuyo principio activo es de naturaleza biológica y son producido por biotecnología”. Dentro de estos productos destacan las proteínas, cuyo desarrollo a escala industrial ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas de ADN recombinante que han permitido la producción de proteínas recombinantes en sistemas de expresión heterólogos. De esta manera, el primer biofármacos de naturaleza proteica fue la insulina humana recombinante, la que fue producida por su expresión en *Escherichia coli* y comercializada a partir en 1982 por Lilly, marcando un hito en el desarrollo de estos fármacos (Rader, 2008).

A partir de entonces el desarrollo de proteínas recombinantes terapéuticas ha evolucionado a la producción de proteínas más complejas destacando entre ellas los anticuerpos terapéuticos (AcT) los que se han convertido en unos de los fármacos de mayor venta en la industria (Figura 1).

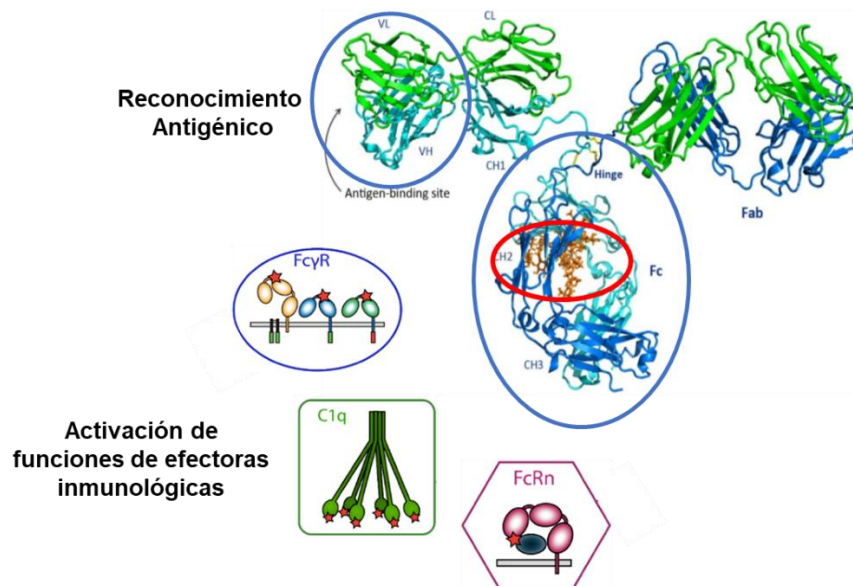


Figura 1. Estructura de un anticuerpo. Representación de la estructura de un anticuerpo Ig Gamma 1 donde mediante circunferencias azules se señalan; una de las regiones variables, que está asociada al reconocimiento de antígenos, y la región constante, asociada a la activación de funciones efectoras. Además, se muestran representaciones del receptor de Fc de inmunoglobulinas gamma (FcyR), la subunidad del complemento C1q, y del receptor neonatal (FcRn), los cuales interaccionan con la región constante y su afinidad es afectada por el patrón y calidad de la glicosilación de los anticuerpos. La glicosilación es resaltada por una circunferencia roja. (Figura adaptada de Chiu y col. 2019).

El éxito de los AcT se debe a la naturaleza propia de los anticuerpos que son moléculas que reconocen antígenos específicos (Tiller y Tessier, 2015) y además, son capaces de modular el sistema inmunológico (de Taeye y cols., 2019). Ambas actividades son independientes desde el punto de vista estructural, donde las regiones variables son las encargadas del reconocimiento específico del antígeno y la región constante es la responsable de la modulación del sistema inmunológico. La capacidad de generar anticuerpos casi contra cualquier antígeno ha permitido usar los AcT en terapias contra diversas enfermedades, destacando varios tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes, entre otras patologías (Aravena y cols., 2011). Así, la mayoría de los biofármacos de mayor ingreso por ventas son AcT (Urquhart, 2018). Entre 2013 y 2017, se introdujeron 31 nuevos AcTs y 10 biosimilares, con un mercado global de 68 anticuerpos de uso clínico a fines de 2017 (Auclair, 2019). El mercado global de AcTs también ha experimentado una gran expansión, de \$ 3 mil millones en 2000 a \$ 150 mil millones en 2019, equivalente a un aumento de 50 veces en 19 años y proyectando que llegará a 300 mil millones al año 2025. La demanda para la aprobación de anticuerpos para usos clínicos ante organizaciones reguladoras internacionales, como la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) y EMA (Agencia Europea de Medicamentos) ha aumentado sostenidamente en los últimos años, proyectando que esta continuará creciendo (Beck y Reichert, 2013; Walsh, 2014; Lin y cols., 2020).

Los primeros intentos de utilizar anticuerpos con fines terapéuticos surgieron del desarrollo de la técnica descrita por Kohler y Milstein en 1975 (Kohler y Milstein, 1975) para desarrollar anticuerpos monoclonales (mAbs) de origen murinos a partir de hibridomas. Esta técnica permitió seleccionar anticuerpos específicos y producirlos en ascitis de ratón o cultivo de células de hibridomas obteniendo anticuerpos de buena calidad y con niveles de producción suficientes para su producción industrial. Sin embargo su éxito clínico fue limitado, ya que el 50% de los pacientes tratados con estos mAbs generaron una respuesta inmune del huésped frente a los anticuerpos de ratón, conocida como respuesta HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies) (Van Kroonenburgh y Pauwels, 1988), que disminuye la vida media de los anticuerpos y la eficiencia de sus funciones efectoras o inducir un shock (Carter, 2001; Presta, 2002).

El desarrollo de la biología molecular en los años 80 permitió desarrollar anticuerpos recombinantes (AcRs), la que dio paso a la técnica de quimerización de anticuerpos. Esta técnica fue desarrollada por Morrison y col. (Morrison y cols., 1984) y Boulliane y col. (Boulliane y cols., 1984), mediante el aislamiento de las regiones variables de los genes de un

mAb de origen murino y su fusión con las regiones constantes de inmunoglobulinas humanas, dando paso a la generación anticuerpos quiméricos (AcQ). Los AcQ fueron expresados en líneas de origen animal y disminuyeron la respuesta inmune contra las inmunoglobulinas, permitiendo generar los primeros AcRs exitosos para el uso clínico, tales como infliximab (anti-TNF) y Rituximab (anti-CD20). A continuación, ha sucedido un constante mejoramiento en el diseño de los anticuerpos que llevó a la generación de anticuerpos humanizados, que solo conservan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo murino, siendo todo el resto de la molécula de origen humano (Matteson y cols., 1995). Posteriormente, se desarrollaron los anticuerpos completamente humanos, obtenidas mediante librerías de genes de inmunoglobulinas expresadas en la superficie de fagos filamentosos, o bien a partir de ratones humanizados en los cuales los genes de inmunoglobulinas del ratón fueron reemplazados por genes de inmunoglobulina humanas y más recientemente mediante la técnica de aislamiento y secuenciación ADN de células únicas desde linfocitos B (Doevendans y Schellekens, 2019; Green y cols., 1994; Vaughan y cols., 1998; Pedrioli, A., y Oxenius, 2021).

Los anticuerpos son moléculas estructuralmente complejas lo que dificulta su producción en células procariontes y obliga a su producción en células eucariontes para mantener su funcionalidad. Por un lado, los anticuerpos son proteínas de gran tamaño, de aproximadamente 150KDa, formadas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas idénticas de mayor peso y dos cadenas idénticas de menor peso denominadas, respectivamente, cadena pesada (H, del inglés Heavy Chain) y liviana (L). Ambas cadenas H están unidas entre sí y cada L se une a una H por puentes disulfuro. Por otro lado son glicoproteínas y su correcta glicosilación es esencial para su estabilidad, donde por ejemplo la unión al receptor neonatal para la región Fc (FcRn) que promueve la sobrevida de las moléculas en la sangre protegiéndolas de ser catabolizadas por los fagocitos, como también son esenciales para la calidad de las funciones efectoras; como la activación del sistema del complemento (CDC), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y fagocitosis (Ferrara y cols., 2006).

Producción de AcRs en células de origen animal.

Como se expresó anteriormente los patrones de glicosilación de los anticuerpos constituyen un elemento funcional relevante en la molécula ya que además de garantizar la seguridad del uso clínico de los AcRs es necesario que estos patrones de glicosilación sean similares a los presentan los anticuerpos humanos para que garanticen su baja inmunogenicidad (Tejwani y cols., 2018). Debido a ello el principal sistema de expresión de

los AcRs lo constituyen las células mamíferas. Existen diversas líneas celulares que han demostrado ser capaces de generar AcRs con patrones de glicosilación compatibles con el uso humano. Entre estas destacan las líneas de origen humano HEK293 y PerC6 (Fallaux y cols., 1998; He y cols., 1998), o líneas de mieloma de origen murino, NSO (Bebbington y cols., 1992) y las células de ovario de hámster chino (CHO). Sin embargo, han sido las células CHO las que han dominado en la industria biofarmacéutica (Kunert y Reinhart, 2016).

Células de Ovario de Hámster Chino

Las células CHO fueron obtenidas a fines de los años 50 a partir de células inmortalizadas espontáneamente de cultivos primarios de ovario de hámster chino (Puck y cols., 1958) y han demostrado generar el ensamblaje correcto de AcRs con patrones de glicosilación compatibles con su uso (Werner y cols., 1998). De estas derivaron las líneas CHO-K1 (Kao y Puck, 1968) y CHO-S (Gottesman, 1987), siendo esta últimas capaces de crecer en cultivos en suspensión y en medio libre de suero. Las células CHO-DG44 fueron obtenidas de CHO originales sometidas a irradiación gamma seguido de una detección de la ausencia de actividad de dihidrofolato reductasa (DHFR) (Urlaub y cols., 1983). Las células CHO-DG44 permiten la selección de líneas estables que integran constructos que expresan un gen interés junto al gen de la *DHFR* en medios que carecen de hipoxantina y timidina y generan amplificación génica de los genes recombinantes ante la presencia de metotrexato. Las células CHO-DG44 se usan ampliamente en la industria biofarmacéutica para generar líneas celulares estables para la producción de AcTs.

Actualmente la industria ha alcanzado productividades del orden de gramos de anticuerpos por litro de cultivos de estas células. Estos logros van de la mano de la capacidad de aislar y analizar un gran número de clones para poder seleccionar clones productores con productividad de anticuerpos de entre 5 a 20 pg/célula/día (Kunert y Reinhart, 2016). Junto a esto, el desarrollo de técnicas ingenieriles tales como el análisis de flujo metabólico ha facilitado la comprensión de los requerimientos nutricionales de las células recombinantes, lo que ha permitido el desarrollo de medios de cultivos optimizados para lograr elevados niveles de densidad celular por extensos períodos de cultivo (Reinhart y cols., 2015).

Promotores de la transcripción de genes recombinantes

La expresión de proteínas en organismos eucariontes están comandadas por promotores reconocidos por la enzima ARN polimerasa de tipo II. Esta polimerasa reconoce secuencias nucleotídicas específicas, tales como las cajas CAAT, TATA y BRE, ubicadas río arriba del

sitio de inicio de la transcripción (TSS), mediante factores proteicos presentes en el complejo de pre-iniciación. Junto con ellos existe otras regiones ubicadas generalmente río arriba del promotor que pueden potenciar o reprimir la actividad del complejo de pre-iniciación denominadas *enhancer* (o potenciador en inglés) y represor, respectivamente. Tanto el *enhancer* como el represor poseen sitios de reconocimiento específicos para factores de transcripción que median la interacción del *enhancer* o represor con el complejo de pre-iniciación estimulando o reprimiendo la activación de la ARN polimerasa (Kornberg, 2007). La potencia de un promotor depende de la fuerza de interacción de *enhancer* con el complejo de pre-iniciación, la que a su vez está determinada por la diversidad y el número elementos de reconocimiento de factores de transcripción presentes en el *enhancer*. No obstante, independientemente de la fuerza del promotor su actividad transcripcional también va a depender del patrón de expresión de los factores de transcripción de cada tipo celular.

La expresión de AcRs y otros transgenes en células animales se ha basado en el uso de promotores de la transcripción de origen viral, debido a que son promotores fuertes y sencillos, generalmente compuestos por un promotor asociada en forma estrecha a su *enhancer*, ver representación de un *enhancer* promotor en la Figura 2. Entre ellos destacan el promotor CMV (citomegalovirus), el promotor temprano de SV40 (virus 40 vacuolado del simio), o el promotor de RSV (Virus del sarcoma de Rous) (Radhakrishnan y cols., 2008; Kohn y cols., 1987; Conti y cols., 1995).

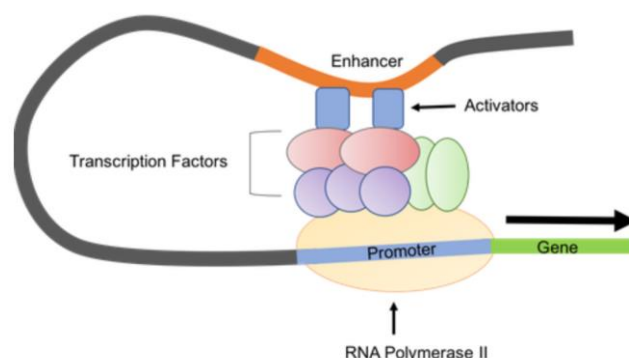


Figura 2. Representación esquemática de un Promotor. Los promotores están normalmente asociados a una región *enhancer*, o potenciadoras. Tanto en la región promotora como la *enhancer* existen elementos de respuesta a factores de transcripción (FT). Los FT unidos a la región promotora permiten su asociación con el complejo RNA polimerasa y los asociados a la región *enhancer* permiten la activación del complejo RNA polimerasa dando inicio a la transcripción.

La producción de proteínas recombinantes en células CHO, se ha basado tradicionalmente en el uso del promotor CMV, el cual es el *enhancer*/promotor principal de los genes inmediatamente tempranos del citomegalovirus humano (Boshart y cols., 1985; Foecking y Hofstetter, 1986). Este fue descubierto por Mark Stinski en la década de 1980 (Stenberg y cols., 1984) (Thomsen y cols., 1984), y patentado en 1992 (Stinski, 1992).

El promotor CMV contiene un Core que incluye una caja TATA (Brown y cols., 2014) y la fuerza de este promotor se debe a su *enhancer*, el que se encuentran dentro de los 610 pb río arriba del sitio TSS (Stinski y Isomura, 2008). Contiene elementos de respuesta del factor nuclear (NFκ-B, TFRE, AMP cíclico y el elemento CRE) que parecen ser responsable de gran parte de la actividad del promotor CMV en las células CHO (Brown y cols., 2015). Si bien es un promotor constitutivo, este exhibe regulación transcripcional dependiente del ciclo celular, estando activo principalmente en la fase S y muestra muy baja actividad en G0/G1 (Brightwell y cols., 1997).

La comparación de la fuerza del promotor CMV con otros promotores virales y de mamíferos ha demostrado que CMV permite obtener niveles más altos de expresión de proteínas en todas las configuraciones estudiadas (Foecking y Hofstetter, 1986; Ho y cols., 2014). Así, la fuerza demostrada de este promotor ha hecho que siga siendo el promotor de la transcripción más utilizado para la expresión transgénica tanto en la investigación como en la producción industrial (Ho y Yang, 2016). Sin embargo, un problema habitual con los transgenes bajo el control del promotor CMV, al igual que con otros promotores virales, es que se silencian gradualmente en un período de semanas a meses en cultivo luego de su inserción en el genoma de la célula hospedera (Choi y cols., 2005; Krishnan y cols., 2006; Brooks y cols., 2004) (Figura 3). Este silenciamiento finalmente conlleva a la reducción de la productividad volumétrica de proteínas recombinantes en tiempos de cultivos prolongados en ausencia de medio de selección (Yang y cols., 2010; Moritz y cols., 2015; Osterlehner y cols., 2011). Normalmente los clones productores de AcRs son generados por transfecciones que producen inserciones al azar de los genes recombinantes dentro del genoma de la célula huésped. Luego clones estabilizados son analizados para seleccionar los clones de mayor producción. De esta forma los laboratorios de I+D, las empresas biotecnológicas y biofarmacéuticas invierten cuantiosos recursos en el análisis de miles de clones para seleccionar clones de alta productividad.

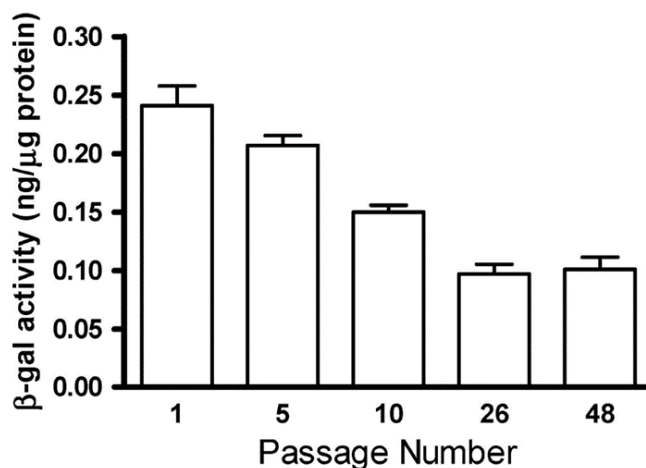


Figura 3. Decaimiento de la actividad del promotor CMV en cultivos estables. Ensayo de actividad reportera de la transcripción del promotor CMV basado en la actividad β-galactosidasa, donde células CHO fueron transfectadas con un vector donde el gen *LacZ* está comandado por el promotor CMV. Se representa la actividad β-galactosidasa de un clon en función del número de pasaje, donde se observa el decaimiento de la actividad β-galactosidasa a lo largo de 48 pasajes (Extraído de Choi y cols 2005).

Mecanismos de silenciamiento de promotores.

El mecanismo de silenciamiento génico de estos promotores aún no ha sido completamente dilucidado, (Brooks y cols., 2004; Swindle y Klug, 2002; Yang y cols., 2010). Sin embargo, la evidencia hasta el momento apunta a la susceptibilidad a la represión transcripcional por metilación del ADN. Así, reportes mostraron que la metilación *in vitro* del promotor CMV en sitios ricos de secuencias de dinucleótidos 5'-C-fosfato-G-3' (CpG) en forma previa a la transfección conduce a la inactivación del promotor (Prosch y cols., 1996). Luego, se demostró que el silenciamiento del promotor CMV puede ser revertido por agentes inhibidores de la metilación del ADN como 5'Azacitidina en células de mamífero recombinantes transfectadas de forma transitoria o estable (Escher y cols., 2005; Krishnan et al., 2006), junto a la comprobación de que el silenciamiento y la metilación *in vivo* del promotor CMV están asociadas (Brooks y cols., 2004; Kong y cols., 2009). Mas tarde, Yang y cols. (2010) demostraron que la metilación del promotor CMV puede, al menos en parte, contribuir a la pérdida de productividad de líneas de células CHO productoras de AcRs.

En eucariotas, particularmente en mamíferos, la metilación del ADN está involucrada en la formación de estados de cromatina transcripcionalmente represivos y en el mantenimiento de la estabilidad del genoma (Du et al, 2015). Esta ocurre mediante la metilación enzimática del ADN en el carbono 5 de las citosinas dentro de los dinucleótidos CpG (Osterlehner y cols., 2011). Así, la sensibilidad del promotor CMV a la metilación se debe a que este contiene un

número superior a la media de dinucleótidos CpG diseminados dentro de su *enhancer* río arriba de TSS (Kim y cols., 2011). Sin embargo, aparentemente solo la metilación en sitios específicos, y no a un nivel general, es decisiva para la pérdida de la actividad promotora de CMV (Moritz y cols., 2015; Osterlehner y cols., 2011). Por ejemplo, se sabe que la metilación del ADN en sitios de reconocimiento para el factor de transcripción Sp1 inhibe la unión de este factor, lo que provoca el silenciamiento del promotor (Mulero-Navarro y cols., 2006). Junto con lo anterior, la construcción de un promotor CMV libre de CpG no conduce a una mejora significativa de la transcripción a largo plazo en líneas CHO transfectadas de forma estable (Ho y cols., 2016), indicando que los dinucleótidos CpG cumplen un papel en la actividad del promotor.

Por otro lado, el tratamiento con inhibidores de la deacetilasa de histonas HDAC, tales como tricostatina A (TSA), previene eficazmente el silenciamiento del promotor CMV (Spenger y cols., 2004), mostrando que el silenciamiento está finalmente determinado por mecanismos epigenéticos, que determinan el estado de la cromatina, y la accesibilidad de la maquinaria transcripcional al promotor recombinante.

Las islas CpG disminuyen el silenciamiento transcripcional de los promotores recombinantes.

Las islas CpG corresponden a regiones de ADN ricas en dinucleótidos CpG y con un contenido de GC mayor a la esperada por el simple azar y de un largo mínimo de 200 pb. Paradojalmente, pese al gran contenido de dinucleótidos CpG de las islas CpG, muchas de estas regiones se mantienen notoriamente desmetiladas en células ya diferenciadas. Si bien inicialmente se las asoció con promotores de genes *housekeeping*, abarcando más del 80% de estos (Farre y cols., 2007), hoy se sabe que las islas CpG están asociadas al 60% de los promotores, incluyendo genes *housekeeping* y regulables (Antequera, 2003), proponiéndose que el nivel de desmetilación de estas regiones está estrechamente relacionado con la actividad transcripcional (Deaton y Bird, 2011). En las primeras etapas embrionarias todos los promotores están desmetilados, pero durante el desarrollo, muchos son selectivamente metilados y silenciados, permaneciendo activos solo en tejidos específicos (Fatemi y cols., 2005; Kong y cols., 2016; Rauschert y cols., 2017). Así, la asociación del estado de metilación de las islas CpG y el silenciamiento de algunos genes se ha evidenciado mediante la restauración de la expresión de algunos genes silenciados en células tumorales mediante el uso de agentes desmetilantes de ADN (Illingworth y cols., 2010; Rauschert y cols., 2017).

Sin bien los mecanismos por los cuales las islas CpG se mantienen libre de metilación no están completamente dilucidadas, se han revelado algunos mecanismos involucrados. Así se ha reportado que las islas CpG reclutan directamente diversas enzimas nucleares con capacidad de remodelar histonas a través del reconocimiento de dinucleótidos CpG no metilado mediante un dominio de un dedo de zinc denominado ZF-CxxC (Long y cols., 2013). Estas enzimas nucleares pueden participar en mecanismos de resistencia al silenciamiento o bien pueden participar del silenciamiento definitivo del gen. A modo de ejemplo, la desmetilasa de histonas KDM2A, que desmetila específicamente la lisina 36 de la histona 3 (H3K36) reconoce los CpG no metilados por su dominio ZF-CxxC y ayuda a crear una zona de cromatina en la isla CpG completamente libre de metilación en la histona H3, metilación que tiene un conocido efecto inhibitorio en la iniciación de la transcripción (Blackledge y cols., 2010). Así, la acción de esta metilasa y otras enzimas nucleares que poseen el dominio ZF-CxxC condicionan la estructura de los nucleosomas permitiendo que la cromatina adquiera una configuración menos compacta, lo que la hace más accesible a la maquinaria transcripcional (Fuks y cols., 2003; Han y cols., 2011; Jones y cols., 1998; Mahe y cols., 2018). Sin embargo, la interacción de esta desmetilasa con la isla CpG es bloqueada cuando el dinucleótido CpG está metilado (Blackledge y cols., 2010), por lo cual solo participa de la prevención de la metilación. Por otro lado, los complejos represivos Polycomb PRC1 y PRC2, catalizan distintas modificaciones de cromatina que conlleva finalmente al silenciamiento génico heredable de los genes. Esta interacción es mediada por KDM2B/FBXL10 a través del reconocimiento específicamente de CpG no metilado en islas CpG a través de un dominio ZF-CxxC (Long y cols., 2013) y reclutando PRC1 especialmente durante los procesos de diferenciación celular (Farcas y cols., 2012). Sin embargo, si bien es evidente el papel de los dinucleótidos CpG desmetilados como blancos de las maquinarias de resistencia al silenciamiento y del silenciamiento definitivo de un gen, aún no se ha clarificado cuales son los factores que determinan una u otra vía (Moussa y cols., 2019).

Junto a lo anterior, no solo la secuencia CpG está involucrada en la regulación transcripcional sino también la distribución del contenido de nucleótidos C y G que aparentemente determina características estructurales de las islas CpG. Así, se ha descrito que en la mayoría de los promotores con islas CpG del genoma humano existe un sesgo GC, que consiste en una asimetría significativa de la distribución de guanina y citosinas, ubicados entre la parte inmediatamente río bajo de algunos TSS y la unión del primer exón con el primer intrón (Hartono y cols., 2015). Esta propiedad confiere la capacidad a la cadena de ARN rica

en G recién transcrita de volver a unirse a la cadena de ADN rica en C y forzando a la cadena de ADN rica en G hacia una conformación de cadena de simple hebra, formando durante la transcripción estructuras de ácido nucleico de tres cadenas largas y estables llamadas *R-loops* (Ratmeyer y cols., 1994; Roberts y Crothers, 1992). Las estructuras *R-loops* han sido reportadas desde hace mucho tiempo desde bacterias y bacteriófagos a levaduras y mamíferos (Li y Manley, 2006). Se ha sugerido además que la formación de *R-loop* en isla CpG puede evitar la metilación de la secuencia de ADN subyacente (Ginno y cols., 2013) y estabilizar el complejo de transcripción (Ginno y cols., 2013).

Si bien el mecanismo de la actividad constitutiva de los genes *housekeeping* no ha dilucidado completamente, se ha propuesto que las islas CpG asociados a los promotores de estos genes son las principales responsables. Así, diversos trabajos han propuesto el uso de promotores de genes *housekeeping* para la expresión de genes recombinantes de células de mamíferos.

Uno de los genes *housekeeping* más estudiados es el gen de β -actina (*ACTB*). Este gen codifica para una proteína esencial para la integridad celular, exhibiendo niveles de expresión constantes en la mayoría de los linajes celulares (Eisenberg y Levanon, 2013). El promotor de este gen contiene una isla CpG en su porción de 5' que incluye un TSS, el primer intrón, hasta el segundo exón (Gardiner-Garden y Frommer, 1987). Debido a su carácter constitutivo se ha estudiado el uso potencial del promotor del gen de *ACTB* de diferentes especies para la expresión de transgenes, reportándose ejemplo de humano (Damdindorj y cols., 2012), pollo (Kosuga y cols., 2000), camarón (Shi y cols., 2016), peces (Feng y cols., 2006; Xiao y cols., 2011) y anfibio chino (Feng y cols., 2014).

Promotores recombinantes resistentes al silenciamiento génico

Diversas estrategias han sido utilizadas para generar promotores resistentes al silenciamiento génico y de esta forma mejorar la productividad de AcRs. En las que destacan el uso de elementos génicos del genoma para reducir el silenciamiento de los promotores virales, como por ejemplo S/MARTs y UCOES.

Antoniou y cols., 2003, insertaron un UCOE río arriba del promotor CMV confiriendo mayor producción de proteínas recombinantes. El UCOE descrito corresponde a la zona intergénica del promotor divergente, HNRPA2B1–CBX3 (Antoniou y cols., 2003) (Figura 4A). Los UCOEs se caracterizan por su capacidad para conferir un sitio de expresión transgénica estable independiente del sitio de integración y que sea proporcional al número de copias del

transgén, incluso cuando se integran en heterocromatina (Antoniou y cols., 2003). Una característica distintiva de los UCOE es la presencia de islas CpG (Muller-Kuller y cols., 2015) y pareciera ser que estas determinan su funcionalidad (Figura 4B).

Islas CpG también se han utilizado para mejorar la actividad del promotor CMV. Así, Mariati y cols., 20014, utilizaron una isla CpG del gen *housekeeping* adenina fosforibosiltransferasa (*APRT*) de hámster para mejorar la estabilidad de la expresión en células CHO insertando una porción de esta isla CpG entre el *enhancer* y el Core del promotor CMV. Esto sugiere que el fragmento de isla CpG utilizado ayuda a disminuir la tendencia al silenciamiento del promotor CMV en líneas estables.

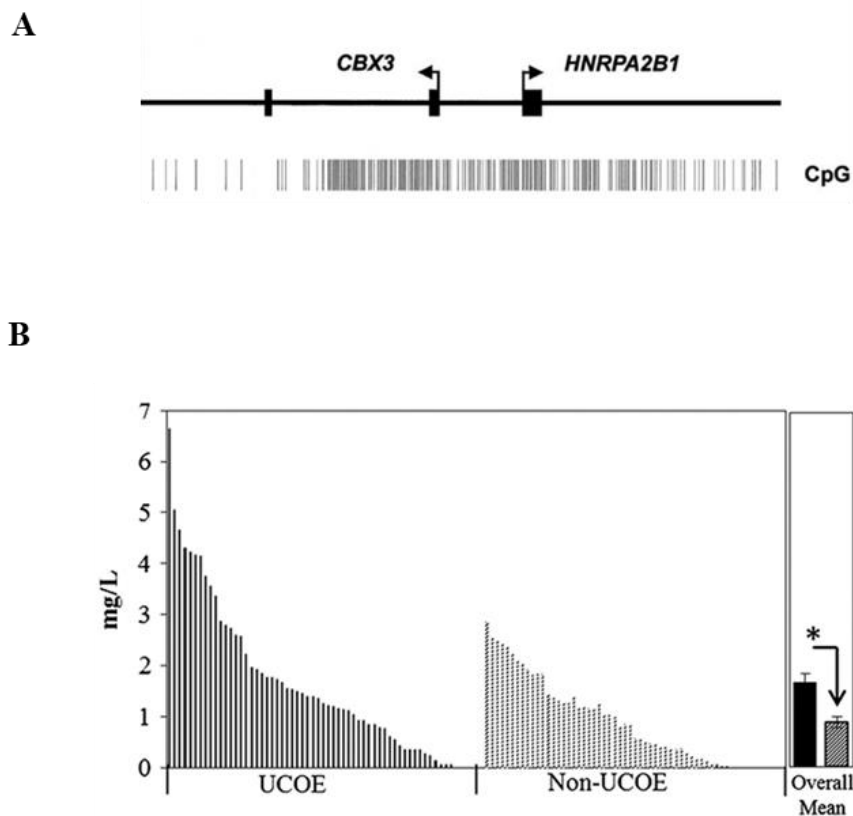


Figura 4. Asociación de un UCOE con promotor CMV aumenta la frecuencia de clones de alta producción. Se asoció un OCOE de 8Kb río arriba del promotor CMV para la expresión de eritropoyetina (EPO). Las células fueron transfectadas y sometidas a la inducción de la amplificación génica con metotrexato MTX). Se comparó la producción anticuerpos desde clones estables con el promotor CMV asociado al UCOE respecto a los clones asociados al promotor sin UCOE (Extraído de Betts y Dickson 2015).

Un promotor basado en el gen *housekeeping ACTB* que fué exitoso para la producción de proteínas recombinantes es el promotor CAG (Dou y cols., 2021). En esta construcción se reemplazó el *enhancer* del gen *ACTB* de pollo por el *enhancer* del promotor CMV (Damdindorj y cols., 2012) manteniéndose el promotor proximal, el primer exón, una gran parte del primer intrón, seguido por el aceptor de corte y empalme de un intrón gen de globina β de conejo (Miyazaki y cols., 1989; Niwa y cols., 1991). El éxito de este promotor aparentemente se debe a la combinación de la potencia del *enhancer* de CMV y la resistencia al silenciamiento del promotor de ACTB.

Estos ejemplos muestran como la combinación de potencia de promotor dada por un *enhancer* fuerte y estabilidad de la expresión génica dada por islas CpG de genes *housekeeping* en diferentes combinaciones permiten diseñar promotores robustos para sostener la producción de proteínas recombinantes a niveles elevados.

Promotores inducibles

El promotor CMV es un promotor constitutivo, lo que determina que existe una asociación entre la proliferación celular y la producción de proteínas recombinantes. El uso de un promotor inducible podría disociar esta relación al inducir la actividad del promotor en momentos del cultivo cuando ya se ha alcanzado una densidad celular suficiente para permitir una producción elevada.

Los promotores inducibles pueden ser activados directamente en respuesta a diferentes tipos de estímulos extracelulares, pudiendo ser estos estímulos de naturaleza físicas o químicas. Los promotores inducibles basados en inductores químicos que pueden ser agregados en los medios de cultivos pueden ser útiles en los sistemas de producción de proteínas recombinantes. Estos pueden permitir aumentar la expresión de proteínas recombinantes en el momento más adecuado durante el cultivo, evitar los efectos tóxicos producto de la sobreexpresión de proteínas, especialmente en las fases iniciales de los cultivos. Sin embargo, hasta el momento no se han desarrollado promotores inducibles eficientes para controlar la expresión de genes en líneas celulares de mamíferos.

El uso de sistemas de inducción para el control de la expresión de genes recombinantes en células es el Sistema Tet-on/Tet-off basada en el estímulo con tetraciclina ha sido muy útil en la investigación de la función de proteínas por su capacidad de expresarlas en el momento apropiado del cultivo (Das y cols., 2016). Sin embargo, este sistema está limitado por la interferencia de la traducción causada por la tetraciclina en las mitocondrias (Moullan y cols.,

2015) y, además, no está ajeno a la tendencia a silenciarse tal como ocurre con otros promotores recombinantes (Zhu y cols., 2007).

Reportes previos han mostrado la generación de promotores inducibles por la adición de secuencias consenso de elementos de respuesta a receptores de hormonas esteroidales río arriba del Core del promotor de CMV. Estas construcciones permitieron aumentar la actividad transcripcional por la adición de estrógeno o dexametasona en el cultivo en ensayos de expresión transiente (Ankenbauer y cols., 1988; Strahle y cols., 1988b).

Los receptores a hormonas esteroidales son un tipo receptores nucleares (RN) que constituyen un grupo diverso de factores de transcripción eucariontes que participan en una variedad de procesos biológicos, controlando la transcripción de sus genes diana tras la unión de ligandos hormonal (Aoyagi y cols., 2005). Existen tres categorías principales de RNs, dentro de los cuales, los receptores de tipo I contienen a los receptores de hormonas esteroidales, tales como los receptores de glucocorticoides, de estrógenos, de progesterona, de andrógenos y de mineralocorticoides. Estas hormona, que funciona como ligando de señalización extracelular, activan los receptores para reconocer los elementos de respuesta a receptores nucleares en los promotores, uniéndose como homodímero y activando la transcripción (Trotter y Archer, 2007)(Figura 5). Además, los RNs pertenecen a la superfamilia de ATPasas SNF2 y pueden ejercer un efecto remodelador de la cromatina mediante su subunidad catalítica dependientes de ATP alterando la posición y/o estabilidad de los nucleosomas de una manera no covalente la que puede potenciar la actividad transcripcional (Eberharter y Becker, 2004).

Los elementos de respuesta a hormonas podrían mejorar la actividad del promotor CMV en presencia de la hormona en medios de cultivo, sin embargo, hasta el momento no se ha reportado su uso para este promotor.

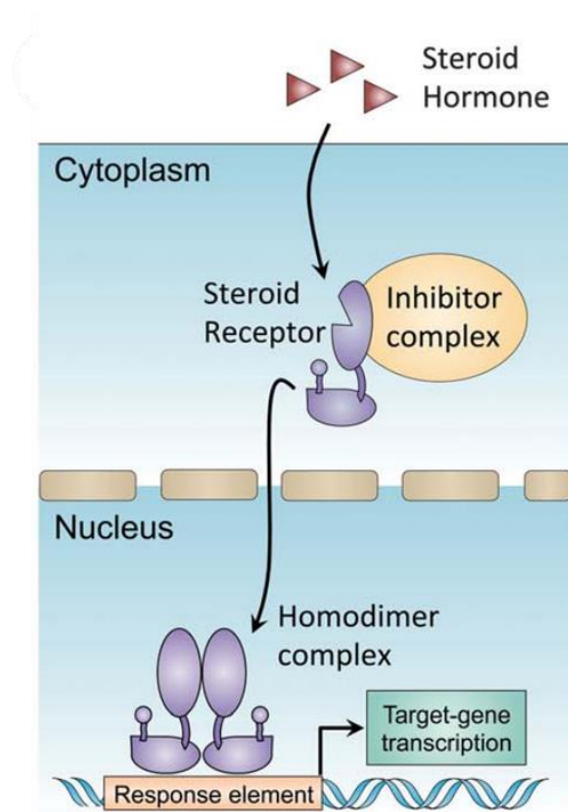


Figura 5. Activación de receptores esteroidales. Representación de la activación de un receptor esteroide por su ligando proveniente del medio extracelular. El receptor activado es internalizado al núcleo donde actúa como un factor de transcripción en genes cuyos promotores contienen elementos de respuesta a este receptor nuclear, ayudando a la activación del promotor y expresión del gen (Extraído de Avior y cols 2013).

Racional

Muchas compañías han informado sobre la generación rutinaria de múltiples clones capaces de producir niveles equivalentes a g/L proteínas empleando integración aleatoria de vectores plasmídicos basados en el promotor CMV (Kunert y Reinhart, 2016). Probablemente esto depende del sitio de integración el gen recombinante, especialmente regiones de eucromatina junto a elementos genéticos que inhiben su silenciamiento transcripcional (Schucht y cols., 2006). Así la obtención de líneas celulares estables con altos niveles de expresión, utilizando técnicas de transfección estándar, es un evento fortuito de baja frecuencia por lo que se requiere de técnicas para la selección de miles de clones para la obtención de un clon productor de características de clon industrial (Carroll y Al-Rubeai, 2004). Mejorar la actividad transcripcional de los promotores en líneas celulares estables puede permitir reducir el número de clones a analizar para seleccionar los clones productores y con ello reducir los costos asociados a su desarrollo.

Dadas las características del promotor CMV de ser un promotor de alta potencia, pero susceptible al silenciamiento transcripcional que hace disminuir la productividad de proteínas recombinantes en cultivo de líneas celulares estables, en este trabajo se propuso probar la capacidad de la isla CpG del gen de *ACTB* de *Cricetulus griseus*, de otorgar resistencia al silenciamiento al promotor CMV para aumentar la expresión de anticuerpos en líneas estables de células CHO, siendo esta isla CpG un elemento endógeno de esta línea celular. Por otro lado, con la idea de generar promotores inducibles se propuso evaluar la capacidad de elementos de respuesta a receptores de hormonas esteroidales para aumentar la expresión del promotor CMV en forma controlada mediante la adición de hormonas en el medio de cultivo. Se espera que la combinación de potencia del promotor, junto al mejoramiento de su estabilidad génica y capacidad de ser inducido en forma controlada permitirá generar un promotor más eficiente para la producción de anticuerpos recombinantes y aumentará el conocimiento para introducir nuevas mejoras.

Para abordar este trabajo se propuso la siguiente hipótesis:

Hipótesis.

La asociación del promotor CMV con una isla CpG y elementos de respuesta a receptores de hormonas esteroidales, aumenta su actividad transcripcional aumentando la producción de anticuerpos recombinantes en líneas estables de células de ovario de hámster chino (CHO), mediante la resistencia al silenciamiento génico y sensibilidad al tratamiento hormonal.

Objetivos:

Objetivo General

Construir un promotor para producción de anticuerpos recombinantes en líneas estables de células CHO de alta actividad transcripcional, resistente al silenciamiento y sensible a un inductor extracelular.

Objetivos Específicos

Para responder la hipótesis se plantearon los siguientes Objetivos Específicos (OE) y Actividades asociadas (A):

OE1.- Construir un promotor híbrido entre promotor CMV, una isla CpG y elementos de respuesta a hormonas esteroidales

A1.1: Identificando y analizando bioinformáticamente una isla CpG asociada al promotor de un gen *housekeeping* en el genoma de células CHO

A1.2: Diseñando la construcción de un promotor resistente al silenciamiento e inducible en respuesta a hormonas esteroidales

A1.2.1: Asociando una porción de una isla CpG con el promotor CMV para generar un promotor híbrido resistente al silenciamiento

A1.2.2: Incorporando elementos de respuesta a hormonas esteroidales en el promotor híbrido para generar un promotor inducible

A1.3: Evaluando in vitro la actividad del promotor híbrido

A1.3.1: Analizando la potencia de los promotores en ensayos de expresión transiente

A1.3.2 Analizando la sensibilidad del promotor híbrido a hormonas en ensayos de expresión transiente

A1.3.3 Analizando la actividad transcripcional de la isla CpG en el promotor híbrido

OE2. Generar un promotor inducible por hormonas esteroidales

A2.1 Analizando la actividad del promotor híbrido con GRE en un sistema reportero de la transcripción

A2.2 Analizando la actividad del promotor híbrido con GRE en un sistema de expresión de anticuerpos recombinantes.

OE3. Generar un promotor resistente al silenciamiento génico

A3.1: Evaluando el silenciamiento génico en un sistema reportero de la actividad transcripcional de líneas estables bajo el control de promotores híbridos

A3.2: Evaluando el decaimiento de la producción de anticuerpos recombinantes de líneas estables bajo el control de promotores híbridos

A3.3 Evaluando la capacidad de generar clones estables de alta producción con el promotor híbrido

Materiales y métodos

Aislamiento de ADN y PCR.

Los plásmidos se purificaron a partir de células DH5 α de *E. coli* transformadas utilizando el Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, EE. UU.) y luego se cortaron con enzimas de restricción de Invitrogen (EE. UU.) o New England Biolabs (NEB, Reino Unido). Los fragmentos de ADN se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega, EE. UU.) a partir de geles de agarosa entre 1 a 1,2% p/v en tampón TBE. El ADN genómico obtenido a partir de células CHO-K1 (ATCC® CCL-61™) se purificó utilizando el kit PureLink™ Genomic DNA Mini (Invitrogen, EE. UU.). Las reacciones de PCR de rutina se llevaron a cabo con el kit GoTaq® Green Master Mix (Promega, EE. UU.). Las reacciones de PCR para sintetizar fragmentos de ADN para clonar se realizaron con ADN polimerasa de alta fidelidad KAPA HiFi HotStart (Kapa Biosystems, EE. UU.).

Cultivo celular y medios.

Células CHO-K1 se cultivaron en condiciones adherentes en el medio químicamente definido DMEM / F12 (GIBCO, EE. UU.), suplementado con suero fetal bovino al 5% v/v y L-glutamina a 100 mM (GIBCO, EE. UU.) a 37°C y 5% de saturación de CO₂. Las células CHO DG44 deficientes en DHFR adaptadas a la suspensión se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific (EE. UU.) a 37°C y 8% de saturación de CO₂. Las células no transfectadas se mantuvieron en cultivos con medio químicamente definido CD-DG44 (Gibco, EE. UU.) suplementado con una mezcla de hipoxantina sódica y timidina (HT).

Diseño y construcción de promotores y plásmidos.

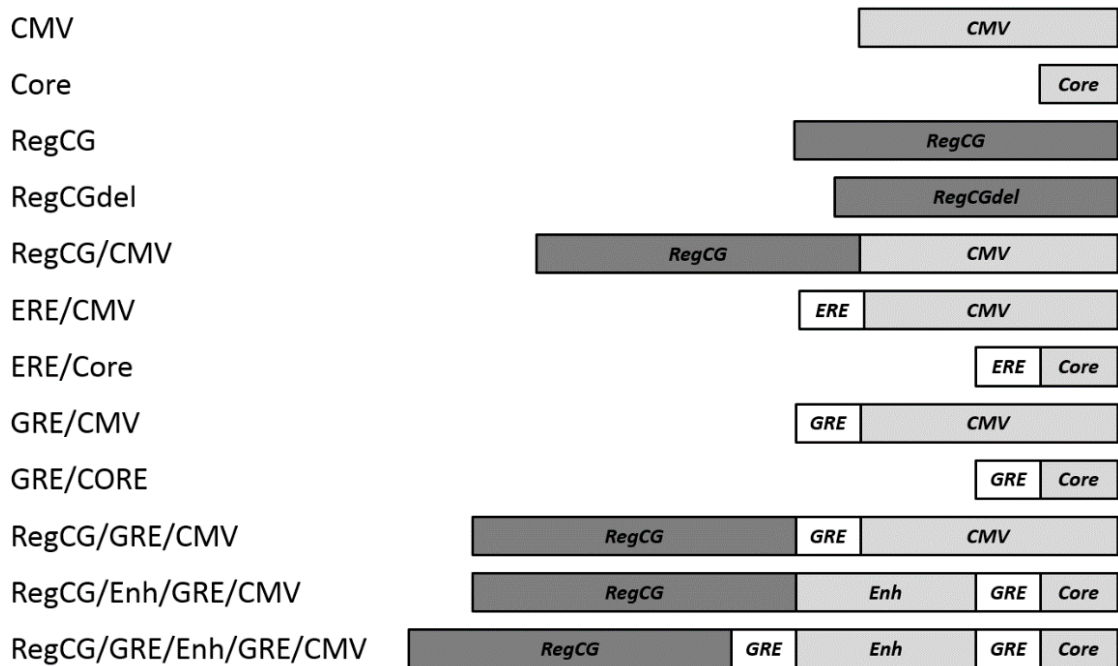
En la Figura 1A se muestra un esquema de los distintos promotores utilizados y construidos. El fragmento RegCG se obtuvo a partir de ADN genómico de células CHO-K1 mediante PCR, utilizando los cebadores PactFw y PactRv (Tabla 1). Los fragmentos del promotor CMV y del Core se obtuvieron mediante PCR a partir del vector pcDNA3.1(-) (Invitrogen, EE. UU.) utilizando los cebadores CMVcFor01 y CMVrev01 para CMV, y CoreFw y CMVrev01 para Core (Tabla 1). Los extremos de los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones contienen los sitios de restricción requeridos para la inserción en los vectores correspondientes (Tabla 1). Para generar el Core del promotor CMV (Figura 2A) y fragmentos de secuencia consenso de elementos de respuesta a glucocorticoides GRE (Figura 2B), se sintetizaron pares de oligonucleótidos de secuencias complementarias de entre 38 y 60

nucleótidos (Tabla 1) que cubren las secuencias de GRE o Core. Cada par de oligonucleótidos estaba desfasado en aproximadamente cinco nucleótidos, para generar extremos cohesivos.

Los vectores reporteros de transcripción se construyeron insertando las secuencias de los promotores en estudio (Figura 6A) en el sitio de policlonamiento del vector pGL4.17 (Promega, EE. UU.) (que antecede a la secuencia codificante del gen *Luciferasa* de luciérnaga (*Luc*) Figura 6B). Los nombres de los vectores reporteros generados se designaron por el nombre del promotor antecedido por la sigla pGL; por ejemplo, pGL-CMV. El vector bicistrónico para la expresión del anticuerpo anti-CD20 humano se construyó modificando el vector reportero de la transcripción pGL-RegCG/GRE/CMV reemplazando el gen *Luc* por un inserto que contiene los genes de las cadenas livianas y pesadas del anticuerpo del anticuerpo anti-CD20, separadas por una secuencia de entrada de ribosoma IRES (Figura 16A). Los vectores para expresar un anticuerpo anti-TNF humano se construyeron de la siguiente forma (Figura 17A); el vector para expresar la cadena pesada (Figura 6A) se construyó reemplazando el gen *Luc* del vector reportero pGL-RegCG/GRE/CMV por el gen de la cadena pesada (TNF-H) de un anticuerpo quimérico anti-TNF alfa humano construido previamente en el laboratorio, generando el vector pRegCG/GRE/CMV-TNF-H. El vector para expresar la cadena liviana se construyó reemplazando el promotor CMV del vector pOptiVEC™-TOPO® (Invitrogen, EE. UU.) por un fragmento que contiene el promotor RegCG/GRE/CMV entre los sitios de restricción *Sall* y *Bam*HI, seguido del gen de la cadena liviana del anticuerpo quimérico anti-TNF humano insertando río arriba de la secuencia IRES del vector pOptiVEC, permitiendo la co-expresión de los genes *anti-TNF-L* y *dhfr*, generando el vector pRegCG/GRE/CMV-TNF-L (Figura 17A).

El tándem de cinco GREs fue insertado en distintas posiciones del promotor híbrido; entre RegCG y CMV generando el promotor RegCG/GRE/CMV, dentro del promotor CMV entre el *enhancer* y el Core, generan los promotores RegCG/Enh/GRE/Core y finalmente una variante que incluye el tándem de GREs en ambas posiciones, generando RegCG/GRE/Enh/GRE/Core, como se muestra en la figura 6A.

A



B

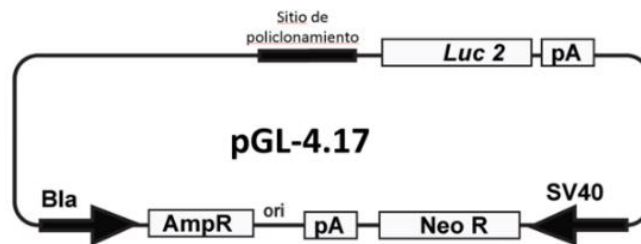


Figura 6. Esquema de la construcción de promotores y vector reportero. A) Promotores construidos en este trabajo. Los recuadros en gris claro representan al promotor CMV y sus derivados Core, y *enhancer* (Enh). Los recuadros en gris oscuro representan a la región derivada de la isla CpG del promotor del gen de *ACTB* (RegCG) y a la delección de RegCG en su porción 5' (RegCGdel). Los recuadros en blanco representan tándems de 4 repeticiones de la secuencia consenso de elementos de respuesta a Estrógeno (ERE) y 5 repeticiones de la secuencia consenso de respuesta a glucocorticoides (GRE). Los extremos de las secuencias de cada construcción incluyen sitios de restricción para ser clonados en el sitio de policonamiento del vector reportero de la transcripción pGL4.17. **B)** Vector pGL-4.17, donde Luc 2 es el gen de luciferasa de luciérnaga, PA es una secuencia de poliadeninas, Neo R, gen de resistencia a neomicina, AmpR, gen de resistencia a Ampicilina, Bla, promotor Bla, ori, origen de replicación, SV40, promotor SV40.

A) Core de CMV

(Corep1F) **GATCT**GTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGG
 (Corep1R) **A**CATTGTTGAGGCGGGTAACTGCGTTTACCGCCATCCGCACATGCCACCCTCCAGATA

(Corep2F) AGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCA
 (Corep2R) TATTCGTCTCGAGAGACCGATTGATCTCTTGGGTGACGAATGACCGAATAG**TTCGA**

B) Tándem de EREs

(EREp1F) **TCGAGC****CAGGTCAGAGTGACCTG**AGCTAAAATAACACATTTCAGC**CAGGTCAG**
 (EREp2F) **C****GGTCCAGTCTCACTGGAC**TCGATTTTATTGTGTAAGTC**GTCCAGTCTCACTGGAC**TCG

(EREp2F) **AGTGACCTG**AGCTAAAATAACACATTTCAGC**CAGGTCAGAGTGACCTG**AGCTAAAATAAC
 (EREp2R) ATTTTATTGTGTAAGTC**GTCCAGTCTCACTGGAC**TCGATTTTATTGTGTAAGTC

(EREp3F) ACATTTCAGC**CAGGTCAGAGTGACCTG**AGCTAAAATAACACATTTCAG**A**
 (EREp3R) **G****GTCCAGTCTCACTGGAC**TCGATTTTATTGTGTAAGTC**TCTAG**

C) Tándem de GREs

(GREp1F) **CG**CTAGC**AGAACA**GGAT**TGTTCT**GATCAAAGAGATCCAAAGTC**AGAACA**CGT**TG**
 (GREp1R) **TCGAG**CGATCG**TCTTGT**CCT**ACAAGA**CTAGTTTCTCTAGGTTTCAG**TCTTGT**

(GREp2F) **TTCT**AGCTAAAATAACACATTTCAG**AGAACA**TGCT**TGTTCT**GATCAAAGAGAT
 (GREp2R) GCA**ACAAGAT**CGATTTTATTGTGTAAGTC**TCTTGT**ACG**ACAAGA**CTAGTTT

(GREp3F) CCAAAGTC**AGAACA**AGG**TGTTCT**AGCTAAAATAACACATTTC
 (GREp3R) CTCTAGGTTTCAG**TCTTGT**CC**ACAAGA**TGATCGATTTTATTGT

(GREp4F) AG**AGAACA**TGAT**TGTTCT**GATCAAAGAGATCCAAAGT**C**
 (GREp4R) GTAAGTC**TCTTGT**ACT**ACAAGA**CTAGTTTCTCTAGGTTTCAG**GAGCT**

Figura 7. Síntesis de insertos de DNA por hibridación de oligonucleótidos, mediante la hibridación de oligonucleótidos y posterior ligamiento con el T4 Ligase a través de los extremos cohesivos generados. Síntesis de: **A)** una porción corta del promotor de CMV (Core). **B)** un tándem de cuatro Elementos de Respuesta Estrógeno (ERE). **C)** un tándem de cinco Elementos de Respuesta Glucocorticoides (GRE). En el celeste se muestran los elementos palindrómicos de los sitios ERE y GRE. En amarillo se muestran los extremos cohesivos compatibles con las enzimas de restricción. Entre paréntesis se indican el nombre de cada oligonucleótido.

Tabla 1. Lista de Cebadores

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Protocolo	Tamaño (pb)
PActFw PActRv	TTTTTTGGAGAGGGGTAAAAAATGCTGC TTTTTTCGGCGAACTATATCAGGGCAC	Clonamiento de RegCG en pGEM-t	2001
PActBamEcoFw PActEcoNotRv	TTTTTTGGATCCGAATTCGGAGAGGGGTAAAAAATGCTGC TCAACGCGGCCGCAAAAAGAATTCGGCGAACTATATCAGGGCAC	Sub clonamiento de RegCG	2031
CMVcFor01 CMVrev01	TTTTTTAGATCTGTTGACATTGATTATTGACT TTTTTTAAGCTTTCGATAAGCCAGTAAGCAGT	Clonamiento de promotor CMV	646
EnhEcoNotFw: EnhBglSalRv:	TCGCCGAATTCCTTTTTGCGGCCGCGTTGACATTGATTATTGACT AAAAAAGTCGACAGATCTCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACA	Clonamiento Enhancer CMV	565
CMVmP1F1 CMVmP1R1	GATCTGTAACTCCGCCCATTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGG ATAGACCTCCACCGTACACGCCTACCGCCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACA	Síntesis del Core	pair 1
CMVmP2F1 CMVmP2R1	AGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTATCA AGCTTGATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTGCTTAT		pair 2
GREp1F GREp1R	CGCTAGCAGAACAGGATGTTCTGATCAAAGAGATCCAAAGTCAGAACACGTTG TGTTCTGACTTTGGATCTCTTTGATCAGAACATCCTGTTCTGCTAGCGAGCT	Síntesis de GRE	pair 1
GREp2F GREp2R	TTCTAGCTAAAATAACACATTCAGAGAACATGCTGTTCTGATCAAAGAGAT TTTGATCAGAACAGCATGTTCTCTGAATGTGTTATTTTAGCTAGAACAACG		pair 2
GREp3F GREp3R	CCAAAGTCAGAACAAGGTGTTCTAGCTAAAATAACACATTC TGTTATTTTAGCTAGAACACCTTGTCTGACTTTGGATCTC		pair 3
GREp4F GREp4R	AGAGAACATGATGTTCTGATCAAAGAGATCCAAAGTCC TCGAGGACTTTGGATCTCTTTGATCAGAACATCATGTTCTCTGAATG		pair 4
InrPActFw01(F1) InrPActFw02(F2) InrPActFw03(F3) INTPActFw01(F4) INTPActFw02(F5) INTPActFw03(F6) CMVrev03 (R1)	GCCACTGTCGAGTCCGCG CCCGCAGCACAGGCCTT CACCCGCCACCAGGTAAG GGGTTGCCACTGCGCTTG CGCTTCTGCTGGGTGTG CGGACCAGCGTTTGCCTC TATGGGCTATGAACTAATGACC	Análisis de RT-PCR de RegCG	1302 1280 1237 774 573 449
CMVfor (F7) qLivRev(R2)	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG TTCGAGGCGTAGACTTTGT		839
InrPActFw02(F2) InrPActFw03(F3) INTPActFw02(F5) INTPActFw03(F6) bactCHOFor01 (F8) bactCHOrev01 (R3)	CCCGCAGCACAGGCCT CACCCGCCACCAGGTAAG CGCTTCTGCTGGGTGT CGGACCAGCGTTTGCCTC GCCAACCGTGAAAAGATGACC CACGCTCGGTCAGGATCTTC	Análisis de RT-PCR ACTB	651(p) /1609(np) 1566(np) 902(np) 778(np) 250 -

Subrayado, indica sitio de restricción; **p**, procesado; **np**, no procesado

Transfección de células CHO K1 adherentes

Los ensayos de expresión transiente y la generación de líneas celulares estables, se realizaron utilizando el siguiente protocolo de transfección: las células CHO-K1 parentales se inocularon en placas de 24 pocillos a 300,000 células/mL en 500 μ L de medio DMEM-F12 (Gibco, EE. UU.), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (HyClone, EE. UU.) y L-glutamina a 100 mM (Gibco, EE. UU.) a 37°C y CO₂ al 5%. Al alcanzar entre 80 y 90% de confluencia, las células se transfectaron, para lo cual se eliminó el medio de cultivo y se añadió una mezcla que contenía 500 ng de vector de expresión con 20 μ L de Lipofectamina 2000 CD (Invitrogen, EE. UU.) en 100 μ L de medio OptiMEM (Invitrogen, EE. UU.), y se incubó durante 4 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Luego, se retiró la mezcla de transfección y las células se alimentaron con 500 μ L de medio DMEM-F12 suplementado con un SFB al 10%, y se incubó durante 48 horas a 37°C en de CO₂ al 5%.

Ensayos de reportero transcripcional

Para medir la actividad transitoria de los promotores, las células CHO-K1 se co-transfectaron con vectores reporteros de transcripción derivados de pGL4.17 (Promega, EE. UU.) y el vector de normalización pGL4.73 (Promega, EE. UU.), siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células transfectadas se colectaron y se lisaron después de 48 horas de cultivo, de acuerdo con las instrucciones del sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo® (Promega, EE. UU.). Posteriormente, la luminiscencia se midió en un luminómetro Luminoskan ASCENT (Thermo Electronic Corporation, EE.UU.). La actividad del promotor se calculó mediante el cociente entre las actividades de luciferasa de la luciérnaga y la renilla (FIR/REN) y se expresó como unidades de luz relativas (RLU).

Para medir la actividad de los promotores en líneas celulares estables, las células CHO-K1 se transfectaron con vectores reporteros pre-linealizados y se clonaron mediante aislamiento de células a través de dilución limitante en cultivos en placas de cultivo de 96 pocillos con medio DMEM-F12 (Gibco, EE. UU.) en presencia del antibiótico de selección G418 (Gibco, EE. UU.) suplementados con suero bovino fetal (SFB) al 10% v/v (HyClone, EE. UU.) y L-glutamina a 100 mM (Gibco, EE. UU.) a 37°C y CO₂ al 5%. La actividad reportera del lisado celular se determinó utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ (Promega, EE.UU.) y se normalizó mediante la concentración de proteína total determinada por el ensayo de Bradford. La actividad reportera se expresó como unidades

relativas de luminiscencia (URL), equivalentes al cociente entre la luminiscencia y la concentración de proteína total (Luc/Prot).

Generación de líneas celulares anti-CD20 humano productoras de anticuerpos

Las células CHO-K1 se transfectaron con un vector de expresión bicistrónico pre-linealizado que codifica las cadenas pesadas y liviana de un anticuerpo anti-CD20 humano en un vector (pRegCG/GRE/CMV-aC20LH), de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente.

Generación de líneas celulares que producen anticuerpos anti-TNF humanos

Las células CHO DG44 parentales se co-transfectaron con los plásmidos lineales apropiados que codifican un anticuerpo quimérico anti-TNF humano: pRegCG/GRE/CMV-aTNFH y pRegCG/GRE/CMV-aTNFL que codifican la cadena pesada y liviana, respectivamente. Las células se transfectaron utilizando el reactivo del sistema FreeStyle™ MAX (Invitrogen, EE. UU.) Siguiendo las instrucciones del fabricante, con 9 µg de cada vector. Después de la transfección, las células se volvieron a sembrar en el medio selectivo que carecía de medio HT OptiCHO® (Gibco™, EE.UU.), suplementado con L-glutamina 1 mM (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.), y con el antibiótico de selección G418 (Invitrogen, EE.UU.) a 250 µg/mL. Las células se cultivaron hasta que la viabilidad celular alcanzó niveles por debajo del 10% y en este punto, las células viables aisladas mediante una separación de Ficoll, se sembraron en placas de 24 pocillos y posteriormente se escalaron en un matraz T-25 hasta que la viabilidad celular superó al 90%.

Para la amplificación de genes, se utilizó un método basado en metotrexato (MTX). Brevemente, las células se sembraron $0,3 \times 10^6$ células/mL en un medio de selección con MTX añadido en ciclos. Los ciclos se llevaron a cabo bajo las siguientes concentraciones de MTX y G418: 1) 50 nM y 50 µg/mL, 2) 100 nM y 50 µg/mL, 3) 250 nM y 200 µg/mL, y 4) 500 nM y 200 µg/mL. Luego, la población de células productoras se enriqueció por *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) marcando las células un anticuerpo policlonal anti-cadena gamma de inmunoglobulina humana IgG conjugada con ficoeritrina (PE) (eBioscience, EE. UU.), incubadas a 4°C por 30 min. Luego, las células se lavaron con PBS y se sometieron a FACS, dividiéndolas en cuatro grupos según tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A), donde cada grupo se clasificó en dos subgrupos de baja y alta fluorescencia. Las células de los subgrupos de alta fluorescencia se inocularon en matraces a 300,000 células/mL en cultivo en suspensión. Para el aislamiento clonal de líneas celulares derivadas, las células se sembraron en medio semisólido ClonaCell™ (STEMCELL Technologies Inc., Canadá) y después de 15

días de cultivo, se aislaron colonias visibles por aspiración con micropipeta y se sembraron en placas de 96 pocillos con 100 μ l de CD Opti-CHO[®] medium. Posteriormente, los clones seleccionados se cultivaron en Erlenmeyers de 125 mL con agitación de 135 rpm y se evaluó la producción del AcR anti-TNF α , mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de captura de antígeno como se describe en el próximo punto. Finalmente, los cultivos de células productoras de anticuerpos se establecieron haciendo crecer las células a 37°C en un medio BalanCD[®] CHO Growth A químicamente definido (Irvine Scientific, EE. UU.), suplementado con glutamina 4 mM. Las células se cultivaron por duplicado en frascos Spinner de 125 mL (TechneTM, Reino Unido) con un volumen de trabajo de 60 mL y agitación de 70 rpm, sembrando $0,8 \times 10^6$ células/mL con una viabilidad de $\geq 95\%$. Todos los cultivos celulares se incubaron en una incubadora de CO₂ Mco-17Aic (SANYO Electric Co., Ltd., Japón) en una atmósfera enriquecida con CO₂ al 8%.

Determinación de la producción de anticuerpos (ELISA)

La producción de anticuerpos humanos anti-CD20 y anti-TNF humano en células CHO-K1 y CHO DG44 se determinó por la concentración de anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo, cuantificada por un ELISA preparado en nuestro laboratorio y descrito en (Torres y cols., 2018). Brevemente, placas de ELISA se sensibilizaron con un anticuerpo policlonal anti-cadena kappa humana (DAKO) a 2,5 μ g/mL en PBS, durante 16 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, las placas se bloquearon con PBS/BSA al 1% durante una hora a 37°C. A continuación, las placas se lavaron tres veces con PBST y se agregaron los sobrenadantes diluidos en PBST/BSA 1%, y una curva estándar de con un anticuerpo anti-CD20 comercial (Rituximab), que se incubaron durante 2 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron 5 veces con PBST y luego se incubaron con un anticuerpo anti IgG humano, específico para la cadena gama (Abcam), inmunoabsorbido para detectar solo inmunoglobulinas humanas; conjugado a HRP (IgG-HRP, eBioscience), durante 1 hora a 37°C. A continuación, las placas se lavaron 7 veces con PBST y se revelaron con TMB (ThermoFisher Scientific), para posteriormente medir la absorbancia a 450 nm. La concentración del anticuerpo se determinó por la medición de absorbancia a 405 nm y su calibración frente a la absorbancia de pocillos con el Rituximab.

Análisis de la expresión génica por RT-PCR

El ARN se extrajo de las células utilizando el kit total de ARN I de E.Z.N.A.[®] (Omega Bio-tek Inc., EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de

ARN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Synergy 2 (BIO-TEK Instruments, Inc., EE. UU.). Los extractos de ARN (2 µg) se trataron con ADNasa I (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar cualquier rastro de contaminación del ADN genómico. La producción de transcriptasa inversa de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN se realizó utilizando una enzima Affinity Script (Agilent Genomics, EE. UU.) y oligo dT. La amplificación del ADNc específico se llevó a cabo mediante PCR con el kit de mezcla maestra verde GoTaq® (Promega, EE. UU.) y los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1%.

Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos se calcularon con la prueba *t de Student* no paramétrica. Se utilizó ANOVA de dos vías para evaluar ensayos de varios grupos. Todos estos datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 4 (La Jolla, CA, EE.UU.). $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo y al pie de cada figura se describe.

Resultados

OE1.- Construir un promotor híbrido entre promotor CMV, una isla CpG y elementos de respuesta a hormonas esteroidales

Con la finalidad de construir un promotor con alta capacidad transcripcional, resistente al silenciamiento e inducible, se seleccionó el promotor de citomegalovirus (CMV) por ser un promotor fuerte, la isla CpG el gen de beta-actina (*ACTB*) del genoma de células CHO por ser un gen *housekeeping* con resistencia intrínseca al silenciamiento génico y la incorporación de elementos de respuesta a hormonas esteroidales para hacerlo sensible a la hormona.

A1.1: Identificando y analizando bioinformáticamente una isla CpG asociada al promotor de un gen *housekeeping* en el genoma de células CHO

Para identificar la isla CpG asociada al gen *ACTB* de *Cricetulus griceus*, se analizó la secuencia promotora del gen obtenida de un contig de su genoma usando nBLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). La secuencia de este contig se comparó con las secuencias de ADN genómico ortólogo humano, de ratón, de rata y de pollo, utilizando Clustal Omega (Instituto Europeo de Bioinformática, EMBL-EBI) para identificar el promotor y las regiones de codificación (Figura 8). La secuencia se numeró utilizando como referencia la primera base del codón de inicio del gen *ACTB*, asignándole la posición +1, se identificaron elementos conservados filogenéticamente de los promotores del gen *ACTB* en eucariotas (Danilition y cols., 1991; Shen y cols., 2011), como las cajas CAAT (-1126 a -1123), CArG (-1098 a -1089) y TATA (-1066 a -1063), un TSS proximal teórico (-1069) (ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_007648665.4) que inicia el exón I, seguido del intrón I en la región no codificante (-1070 a -7) y finalmente el inicio del exón II (-6) (Figura 4A). En este contexto, utilizando la herramienta Cpgplot de EMBOSS (EMBL-EBI), se identificó una isla CpG de 1304 pb con un contenido de GC del 67.7% (Figura 4B) que comienza en la posición -1182 de la región 5'UTR del promotor y terminando en la posición +122 dentro del exón II (Figura 4A). No incluyendo la región 5' del promotor (-1671 a -1187), sin embargo, incluye los elementos del promotor proximales (cajas CAAT, CArG y TATA), exón I, intrón I y parte del exón II incluyendo una pequeña porción de la región de codificación del gen *ACTB*.

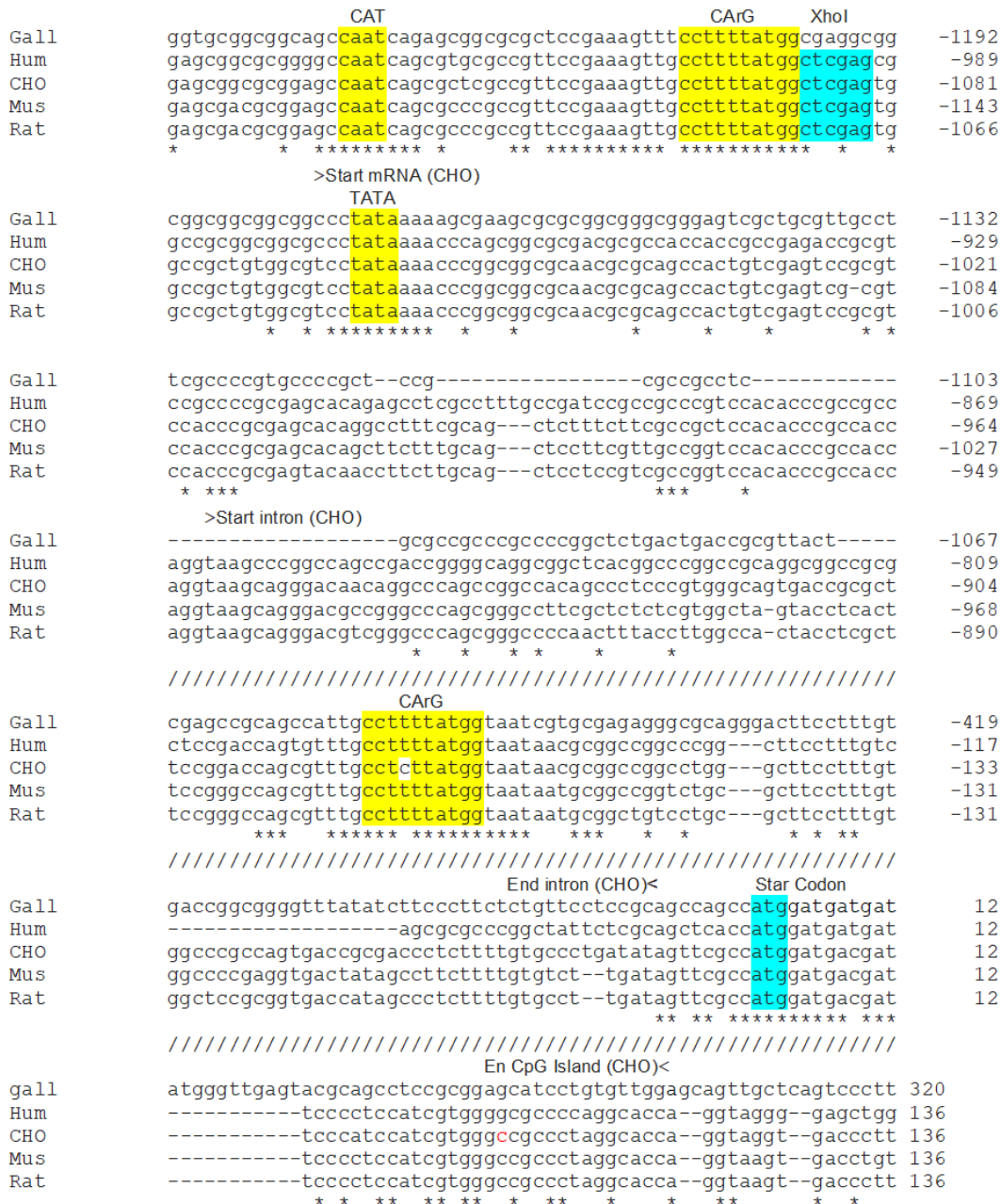
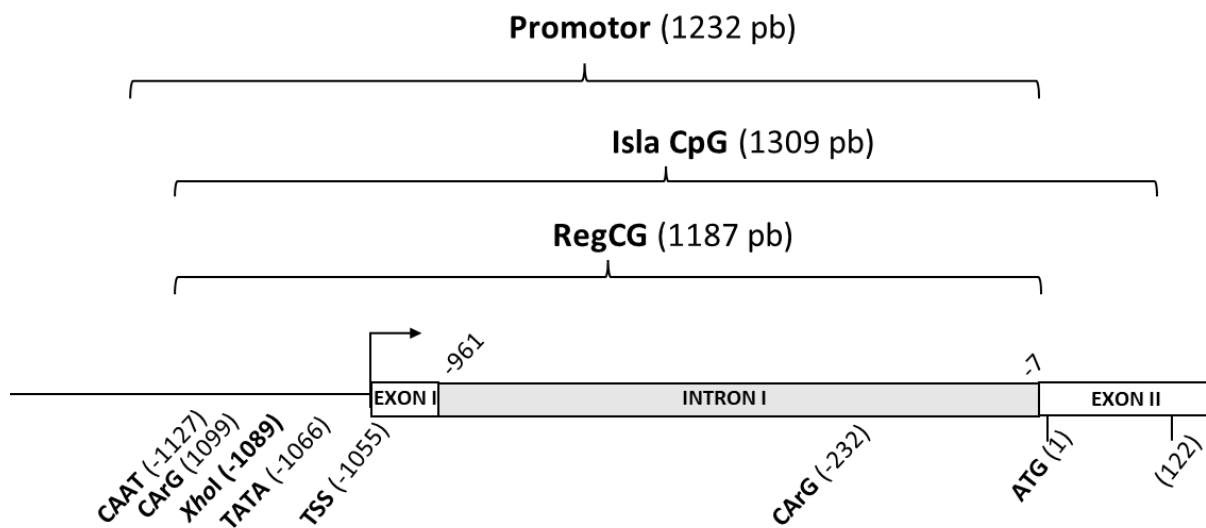
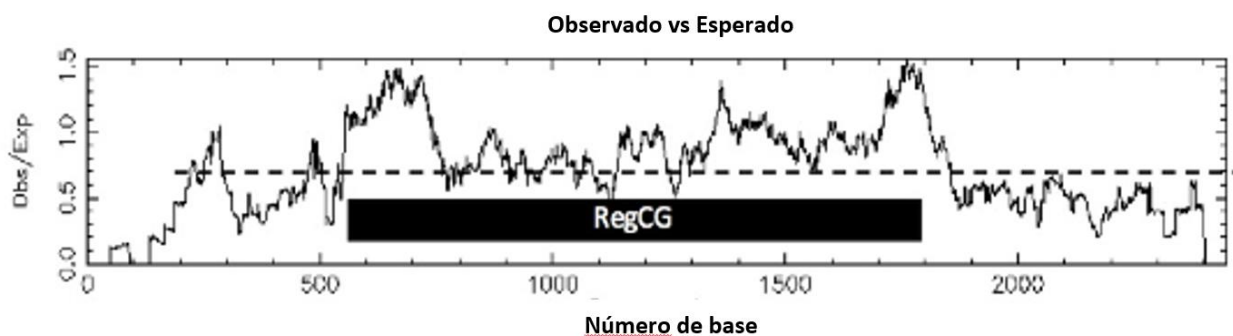


Figura 8. Alineamiento de secuencias promotoras de genes de β actina. Secuencias promotoras de los genes de β actina de pollo (Gall), humano (Hum), hámster chino (CHO), ratón (Mus) y de rata (Rat). En Amarillo, se destacan las cajas CAAT, CARG y TATA. En verde, se destacan el sitio de restricción XhoI y el codón de inicio de β -actina. Las flechas > y < indican el inicio y el final, respectivamente de la isla CpG, el inicio de la transcripción y el intrón I para la secuencia del genoma de la célula CHO. El símbolo repetido “/////” señalan la discontinuidad de las secuencias alineadas.

A



B



https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpplot/0

Figura 9. Isla CpG del promotor de β actina. A) Representación esquemática de la región del gen *ACTB* que contiene una isla CpG, donde se indican; la región promotora, la isla CpG, y una porción de que denominamos RegCG. Además, se indican las cajas CAAT, CArG y TATA, el sitio de restricción *XhoI*, el SST proximal hipotético, el primer exón, el primer intrón, parte del segundo exón y el codón de inicio de la secuencia de codificación de *ACTB* (ATG). B) Gráfico de valores de CpG observados *versus* esperados (Obs/Exp), calculados por el método de (Gardiner-Garden y Frommer, 1987) utilizando la herramienta Cpgplot del Instituto Europeo de Bioinformática (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpplot/), donde la región RegCG se indica en el recuadro interior.

A1.2: Diseñando la construcción de un promotor resistente al silenciamiento e inducible en respuesta a hormonas esteroidales

A1.2.1: Asociando una porción de una isla CpG con el promotor CMV para generar un promotor híbrido resistente al silenciamiento

Para evaluar el efecto de la isla CpG del gen *ACTB* de *Cricetulus griceus* sobre el silenciamiento génico del promotor CMV se seleccionó la región no codificante de la isla CpG (-1188 a -1), fragmento al que denominamos RegCG (Figura 9A). Este fragmento se amplificó mediante PCR y se clonó en el vector reportero de la transcripción pGL4.17 generando pGL-RegCG (Figura 6B). Este vector fue generado para evaluar su posible actividad transcripcional dado que RegCG contiene las cajas CAAT, CArG y TATA. La exclusión de los 122 pb de la región de codificación del gen *ACTB* se realizó para evitar la traducción desde la porción codificante de la isla CpG (Figura 9A).

Posteriormente, se generó el promotor híbrido RegCG/CMV insertando RegCG río arriba del promotor CMV, en el vector reportero pGL-CMV (Figura 6A) (ver materiales y métodos para ver construcción de los vectores reporteros).

A1.2.2: Incorporando elementos de respuesta a hormonas esteroidales en el promotor híbrido para generar un promotor inducible

Para diseñar un promotor inducible se usó como base reportes previos sobre el uso tándems de elementos de respuesta a estrógeno y glucocorticoides río arriba del Core de CMV para inducir su actividad transcripcional en presencia de estrógeno o dexametasona, respectivamente (Ankenbauer y cols., 1988; Strahle y cols., 1988a; Strahle y cols., 1988b). Se sintetizaron dos secuencias de ADN que contenían un tándem de elementos de respuesta a hormonas esteroidales; la primera que contiene un tándem de 4 repeticiones de la secuencia consenso de elementos de respuesta a estrógeno (ERE) (Figura 7B) y la segunda contiene 5 repeticiones de la secuencia consenso de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) (Figura 7C) separadas entre sí por 21 nucleótidos de secuencia irrelevante. Las secuencias sintetizadas fueron clonadas río arriba del promotor CMV en el vector reportero pGL-CMV, generando los vectores pGL-ERE/CMV y pGL-GRE/CMV (Figura 6A). Adicionalmente, se incorporaron estos tándems río arriba del Core de CMV en el vector reportero pGL-Core

generando los vectores pGL-ERE/Core y pGL-GRE/Core para ser utilizados como controles positivos, de acuerdo con lo reportado por Ankenbauer y cols., 1988 y Strahle y cols., 1988a.

A1.3: Evaluando *in vitro* la actividad del promotor híbrido

A1.3.1: Analizando la potencia de los promotores en ensayos de expresión transiente

Para evaluar el efecto de la combinación de RegCG y CMV en la actividad promotora, se generó el promotor híbrido RegCG/CMV insertando RegCG río arriba del promotor CMV, en el vector reportero pGL-CMV generando el vector pGL-RegCG/CMV (Figura 6A).

Para evaluar la potencia de la actividad transcripcional de los promotores diseñados se utilizó un sistema reportero de la actividad transcripcional, transfectando transientemente células CHO-K1 con los vectores reporteros construidos en base al vector pGL4.17 (Figura 6A) y midiendo la actividad luciferasa a las 48 horas post-transfección (ver materiales y métodos). Para la comparación de la actividad de los diferentes promotores se usó como referencia la actividad del promotor CMV a la que se le asignó un valor relativo de actividad igual a 1.

La primera observación para destacar fue la actividad observada para el promotor RegCG, la que fue equivalente al 40% de actividad del promotor CMV y 4 veces superior a la actividad del Core de promotor CMV (Figura 10B). Este resultado muestra que RegCG se comporta como un promotor con una actividad intermedia entre la observada para el promotor CMV y su Core. Debido a esto en los siguientes ensayos se incorporó la actividad del promotor RegCG en las comparaciones de los promotores híbridos.

El promotor híbrido RegCG/CMV mostró un nivel de actividad intermedia entre la actividad de los promotores CMV y RegCG, alcanzando una actividad equivalente al 65% de la actividad del promotor CMV con 1,65 veces más actividad que el promotor RegCG (Figura 10C). La menor actividad del promotor RegCG/CMV respecto a la del promotor CMV probablemente se debe a que la presencia de RegCG interfiere con la actividad del promotor de CMV. Esta suposición se basa en la observación de la actividad del promotor GRE/CMV que también fue menor a la actividad del promotor CMV, sugiriendo que la inserción de otros elementos río arriba de CMV interfiere con la actividad del promotor. De esta forma la actividad remanente del promotor CMV se estaría sumando a la actividad que RegCG en el promotor híbrido. Estos resultados sugieren que la actividad del promotor híbrido

RegCG/CMV es el resultado de un efecto aditivo de las actividades remanentes de las porciones RegCG y CMV del promotor híbrido.

Para analizar la funcionalidad del promotor RegCG se analizó si los elementos CArG y CAAT son funcionales en este promotor. Para este propósito, se construyó una mutante de RegCG en la que se eliminaron las cajas CAAT y CArG cortando por restricción la región ubicada río arriba del sitio de la enzima *XhoI* (RegCGdel) (Figura 6A). Los ensayos de actividad reportera mostraron una disminución de 5 veces de la actividad de la mutante RegCGdel respecto con el promotor RegCG (Figura 10B), lo que sugiere que los elementos CAAT y CArG son críticos para la actividad del promotor. Sin embargo, la inactivación del mutante no fue absoluta, ya que mostró una actividad comparable a la actividad del Core de CMV y fue capaz de aumentar la actividad del promotor Core CMV al asociarla a su región 5' (RegCGdel/Core) (Figura 10B). Es posible que la actividad de la mutante este mediada por la caja TATA cercana al TSS proximal, o bien por la caja CArG presente en la región intrónica de RegCG (Figura 8).

A1.3.2 Analizando la sensibilidad del promotor híbrido a hormonas en ensayos de expresión transiente.

Para probar el efecto de los tándems de EREs y GREs en la inducción del promotor CMV, se realizaron ensayos de transfecciones transiente en células CHO-K1 con los vectores reporteros pGL-ERE/CMV, pGL-GRE/CMV, pGL-ERE/Core y pGL-GRE/Core (ver materiales y métodos). Los cultivos de células transfectadas se estimularon con dosis crecientes de estradiol o dexametasona, ligandos de los receptores de estrógeno y glucocorticoides, respectivamente y se midió la actividad luciferasa a las 48 horas post-transfección (ver materiales y métodos).

Como se observa en la Figura 6A, las células transfectadas con los vectores pGL-ERE/Core y pGL-ERE/CMV, no mostraron inducción de la actividad luciferasa en presencia de estradiol. Si bien se ha descrito que las células CHO expresan el receptor de estrógeno β (Thomas y cols., 2003), aparentemente el nivel de expresión del receptor de estrógeno no es suficiente para activar los promotores que contienen el tándem de EREs. En función de estos resultados se decidió no proseguir trabajando con los EREs.

Respecto al efecto al tándem de GREs se observó un aumento de la actividad luciferasa en las células transfectadas transientemente con pGL-GRE/Core en presencia de dexametasona a partir de una dosis de 25 mM, confirmando la expresión del receptor de glucocorticoides en

estas células (Figura 11C). Sin embargo, al analizar la inducción del promotor pGL-GRE/CMV no se observó un aumento estadísticamente significativo en la actividad reportera (Figura 11E).

A1.3.3 Analizando la actividad transcripcional de la isla CpG en el promotor híbrido

Una de las preguntas que surgen en el promotor híbrido RegCG/CMV es si la porción RegCG es transcripcionalmente activa o solo modifica la actividad de CMV. Para resolver este tema, se realizaron ensayos RT-PCR específicos de la región RegCG del promotor RegCG/GRE/CMV. Para ello, se utilizó un clon de la línea celular CHO-DG44 transfectada establemente con vectores que codifican para un anticuerpo anti-TNF humano bajo el control del promotor híbrido RegCG/GRE/CMV (Figura 12A). Se diseñaron cebadores directos (F) para reconocer distintas posiciones de la región RegCG del promotor híbrido: cebadores F1 y F2 para el exón I; cebador F3 para la intersección exón/intrón; y cebadores F4, F5 y F6 para el intrón I (Figura 12A) y Tabla 1. Para evitar la amplificación del promotor endógeno del gen de la beta-actina, se utilizó un cebador reverso (R) para recoger el *enhancer* del promotor CMV (cebador R1).

La ausencia de amplificación del ADN genómico se confirmó por el tamaño del producto de amplificación con cebadores F8 y R3 (Figura 12B, línea F8/R3). Estos cebadores flanquean un intrón del gen *ACTB* con un tamaño de amplificación esperado de 711 pb a partir de ADN genómico y 256 pb a partir de ARNm.

Las intensidades de las amplificaciones a partir de las muestras de ARNm se compararon con la amplificación a partir de ADN plasmidial de un vector que contiene el promotor híbrido RegCG/GRE/CMV usada como control de carga (Figura 12B, líneas F7/R2).

En estos ensayos, se observó amplificación con los cebadores F1, F2, F4 y F6 en la muestra con ARNm (Figura 12C), lo que demuestra que la porción RegCG del promotor híbrido presenta actividad transcripcional. Además, se observó que el tamaño de los productos de amplificación obtenidos con cebadores F1 y F2 anclados aguas arriba del intrón I y los cebadores F4 y F6 anclados dentro del intrón I, son del mismo tamaño que los obtenidos con su control de ADN plasmidial (Figura 12C, carriles F1/R1, F2/R1, F4/R1 y F6/R1), mostrando que el transcrito no sufre procesamiento del intrón.

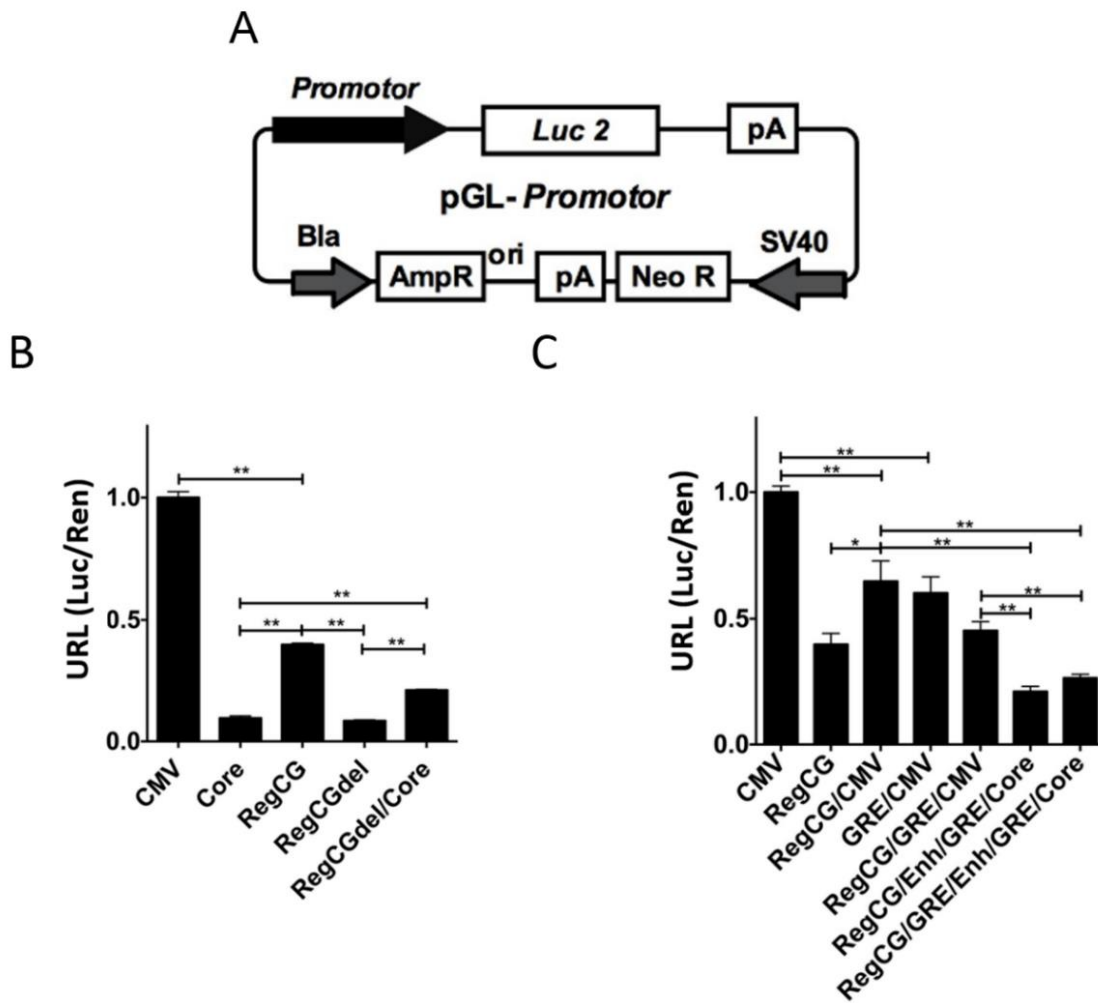


Figura 10. Análisis de actividad de promotores en ensayos de expresión transiente.

Actividad reportera de la transcripción transiente de células CHO-K1 cotransfectadas con los vectores reporteros que expresan el gen de luciferasa de luciérnaga bajo el control de los promotores en estudio y el vector de normalización pGL4.73 (Promega) que expresa el gen de luciferasa de renilla. **A)** Representación esquemática vectores reporteros derivados del vector pGL4.17 que contienen promotores en estudio. **B)** Actividad de RegCG y sus derivados RegCGdel RegCG/Core. **C)** Actividad de promotores híbridos indicado en el eje x del gráfico. Cada punto representa el valor de la actividad, expresado como unidades de relativas de luminiscencia (URL), normalizadas contra la actividad de la renilla con respecto a la actividad promedio del promotor de CMV, que se asignó a un valor de ULR igual a 1.0. La gráfica es representativa de experimentos en duplicado con tres puntos por medición en cada uno y representa la integración de tres experimentos normalizados a través de la actividad promedio de CMV. Los datos se presentan como valores medios \pm S.D. La prueba t no pareada de dos colas se utilizó para el análisis estadístico. * <0.01, ** p <0.05; *** p <0,001

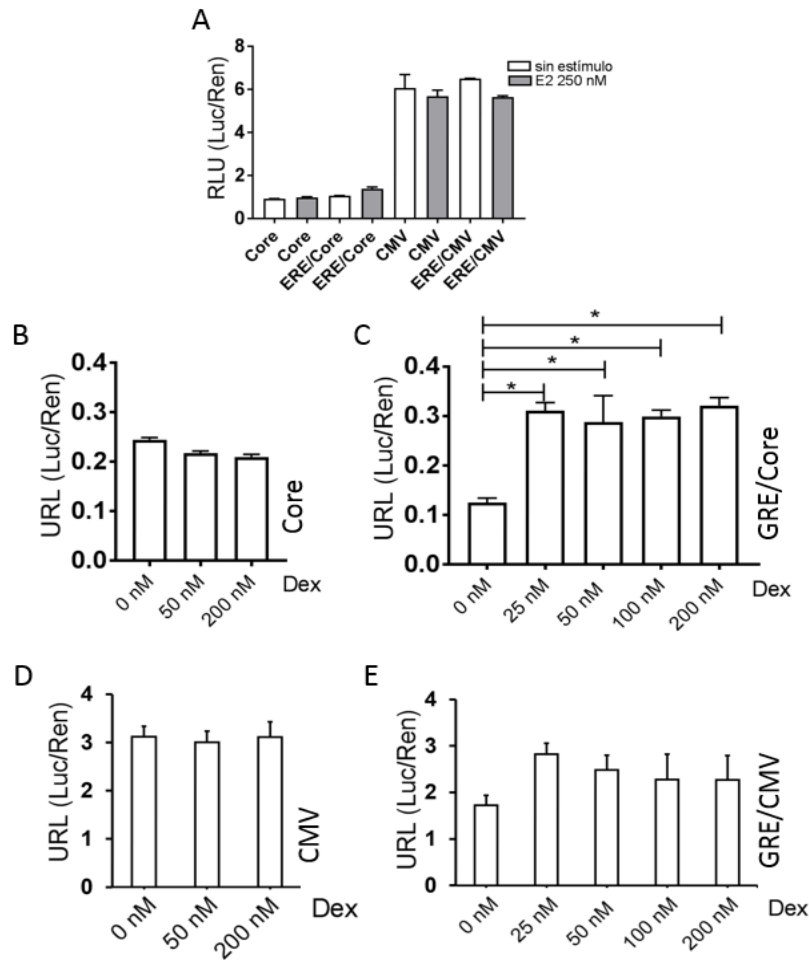


Figura 11. Efecto de un tándem de Elementos de Respuesta a Hormonas Esteroidales en la actividad del promotor CMV mediante transfección transiente. La actividad promotora de cada construcción se probó en ensayos de transfección transiente en células CHO-K1. Las células se co-transfectaron con vectores reporteros que expresan el gen de luciferasa de luciérnaga y con el vector pGL4.73 que expresa el gen de luciferasa de renilla, como control de carga. A las 4 horas post-transfección se estimularon las células con la hormona, prosiguiendo su cultivo por 48 horas, luego de lo cual se midió la actividad de luciferasa de luciérnaga y de renilla. La actividad fue expresada como el cociente entre las Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU) de la luciferasa de luciérnaga y de la luciferasa de renilla (Luc/Ren). **A**). Actividad de los promotores Core, ERE/Core, CMV y ERE/CMV en presencia o ausencia de estradiol (E2) a 250 nM. **B a E**). Actividad de los promotores CMV, GRE/CMV, Core y GRE/Core, respectivamente, en presencia de distintas concentraciones de dexametasona (Dex). La gráfica es representativa de experimentos con tres puntos por medición. La prueba t no pareada de una cola se utilizó para el análisis estadístico. * $p < 0.05$

Cuando se comparó la intensidad de los amplicones obtenidos con los cebadores que reconocen RegCG, se observó que el cebador F6 produjo un amplicón de intensidad notoriamente mayor que la obtenida con los cebadores que recogen RegCG corriente arriba de este, siendo de intensidad similar respecto de su control de ADN plasmidial (Figura 7C, carriles F6/R1). Esta mayor intensidad sugiere que existe un sitio de inicio de la transcripción adicional dentro del intrón, el que se ubicaría entre los sitios reconocido por los cebadores F5 y F6.

Adicionalmente se analizó la transcripción a partir del promotor del gen *ACTB* endógeno (promotor ACTB) para comparar su funcionamiento respecto de la porción RegCG del promotor híbrido. Para ello, utilizando algunos de los cebadores directos utilizados en el análisis de la transcripción del promotor híbrido (cebadores F1, F2, F5 y F6) y un cebador reverso que reconoce la región de codificación del gen *ACTB* (cebador R3) para lograr una amplificación específica del mensajero. En este ensayo se encontró una potente amplificación usando el cebador F1 que se une río abajo del TSS proximal teórico del gen *ACTB* (Figura 7D, F1/R3). El tamaño de producto de amplificación fue correspondiente con el tamaño esperado para el mensajero procesado que es de 744 pb (Figura 7D, F8/R3). Los productos de amplificación obtenidos con cebadores F2, F5 y F6 mostraron tamaños de amplificación que no coincidían con los esperados para el ARN no procesado (Figura 7D, F6/R3), siendo probablemente productos de amplificación inespecíficos. Estos resultados indican que los promotores los promotores ACTB y la porción RegCG del promotor híbrido tienen comportamientos diferentes, donde, en el promotor endógeno el principal responsable de la actividad transcripcional es el TSS proximal, mientras que en la región RegCG del promotor híbrido, aparentemente el principal responsable de la actividad transcripcional es un TSS intrónico.

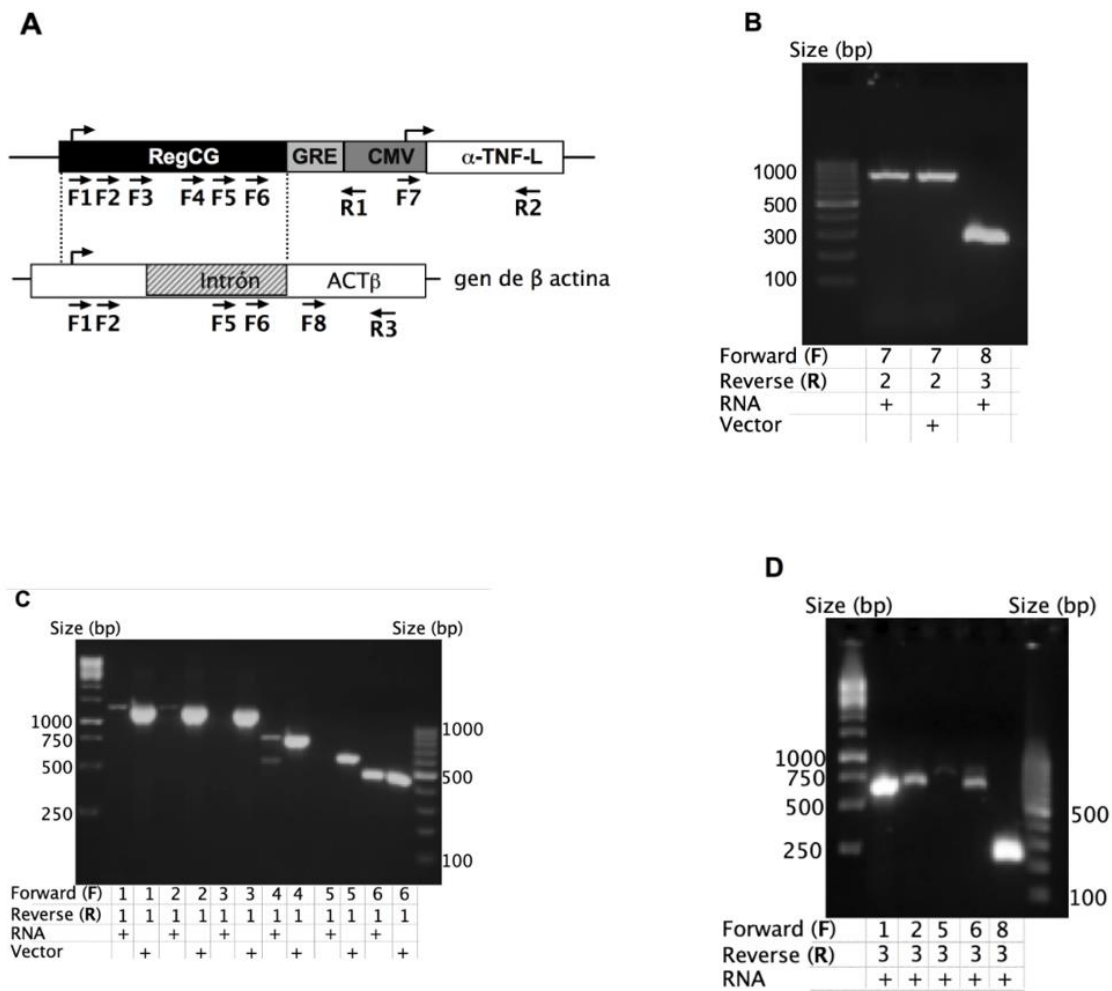


Figura 12. El promotor RegCG tiene un sitio de inicio de transcripción en el primer intrón. El sitio de inicio de la transcripción (TSS) de RegCG en el promotor híbrido RegCG/GRE/CMV se analizó en células derivadas de células CHO DG44 cotransfectadas con vectores pRegCG/GRE/CMV-aTNF-L y pRegCG/GRE/CMV-aTNF-H. El ADNc se preparó a partir de RNA total aislado de un cultivo de células en fase exponencial. Se usaron cebadores que se unen en diferentes partes de RegCG y CMV. **A)** Representación esquemática del gen anti-TNF-L recombinante comandado por el promotor RegCG/GRE/CMV y el gen *ACTB* endógeno. Las líneas de puntos indican la región del gen de la β -actina correspondiente con la porción RegCG del promotor recombinante. Las flechas inferiores indican la posición y la dirección de los cebadores, donde F y R indican los cebadores inversos hacia adelante, respectivamente. Las flechas superiores indican la posición del TSS teórico. **B)** y **C)** Análisis por RT-PCR del promotor recombinante RegCG/GRE/CMV. En la parte inferior de la figura, se indican el ARN (ARN total), el vector (ADN plasmídico del vector pRegCG/GRE/CMV-aTNFL) y los cebadores. Los cebadores utilizados se indican con números correspondientes a la numeración en A. **D)** Análisis por RT-PCR del gen de la β -actina.

OE2. Generar un promotor inducible por hormonas esteroidales

A2.1 Analizando la actividad del promotor híbrido con GRE en un sistema reportero de la transcripción

Para probar capacidad del tándem GREs de transformar el promotor CMV en un promotor inducible se evaluó el efecto del estímulo con dexametasona en clones estables de células CHO-K1 transfectadas con los vectores pGL-RegCG/GRE/CMV y pGL-RegCG/GRE/Enh/GRE/Core y de clones pGL-RegCG/CMV como control de promotor sin GRE. Se inocularon células de clones provenientes de cada transfección en placas de 24 pocillos y al día siguiente se estimularon por la adición de dexametasona a concentraciones de 0; 0,1; 1 y 10 μM , respectivamente, continuando su cultivo por 48 horas. Luego se determinó la actividad promotora expresada como Unidades Relativas de Luminiscencia (URL) calculada por la relación al nivel de luminiscencia producto de la actividad luciferasa y la cantidad de proteínas totales presente en el lisado celular (Luc/prot) (Figura 13). Se analizaron diez clones para cada transfección, donde se observaron dos inducibles para el promotor RegCG/GRE/CMV-Luc (Figura 14A) y tres clones inducibles para el promotor RegCG/GRE/Enh/GRE/Core (Figura 14B). Para clones con el promotor control RegCG/CMV no se observó ningún clon inducible (Figura 14C). Estos resultados muestran que la presencia de GRE río arriba de CMV la otorga la capacidad al promotor de ser inducible frente al estímulo con dexametasona.

Por otro lado, en la figura 14C se muestra un clon representativo de un efecto represor de la actividad promotora del promotor RegCG/CMV por acción de dexametasona. Este efecto represor también fue observado en clones con los promotores RegCG/GRE/CMV y RegCG/GRE/Enh/GRE/CMV, sin embargo, el hecho de ser observado en clones con el promotor control sin GRE indican que este efecto represor no está asociado a la presencia de GRE en el promotor. Reportes han mostrado que existe efectos inhibitorios de la vía de señalización de NF- κ B por acción de glucocorticoides, donde se ha mostrado que existe asociación física y antagonismo funcional entre la subunidad p65 de NF- κ B (p65) y el receptor de glucocorticoides (Ray and Prefontaine. 1994). Esto pudiera explicar la baja frecuencia de clones inductores observados con los promotores RegCG/GRE/CMV y RegCG/GRE/Enh/GRE/Core, donde el antagonismo entre la vía NF- κ B y glucocorticoides pudiera estar enmascarando la inducción de estos promotores frente al estímulo con dexametasona en algunos clones.

A2.2 Analizando la actividad del promotor híbrido con GRE en un sistema de expresión de anticuerpos recombinantes.

Para probar el efecto del tándem de GREs en la inducción del promotor CMV para inducir un aumento en la producción de anticuerpos se construyó un vector bicistrónico para la expresión de un anticuerpo reemplazando el gen de la luciferasa del vector reportero pGL-RegCG/GRE/CMV por los genes de la cadena pesada y liviana de un anticuerpo anti-CD20 humano en una cadena única separados por una secuencia IRES (aCD20-HL) (Figura 16A).

Se evaluó la capacidad de los clones estabilizados productores de anticuerpos provenientes de células transfectadas con el vector biscistrónico pRegCG/GRE/CMV-aCD20-HL de ser inducidos por dexametasona en cultivos en adherencia. Para ello, se seleccionaron 6 clones productores y se cultivaron en placas de 24 pocillos y al día siguiente se estimularon por la adición de dexametasona a concentraciones de 0; 0,8; 1,6 y 3,2 μM , respectivamente, continuando su cultivo por 48 horas para medir la producción de anticuerpos. De este ensayo, se identificaron dos clones (G29 y G54) que responden de manera dosis dependiente a la presencia de dexametasona (Figura 14A), logrando un 34% y 19% de aumento en la producción, respectivamente, a la dosis de dexametasona más alta analizada (3,2 μM).

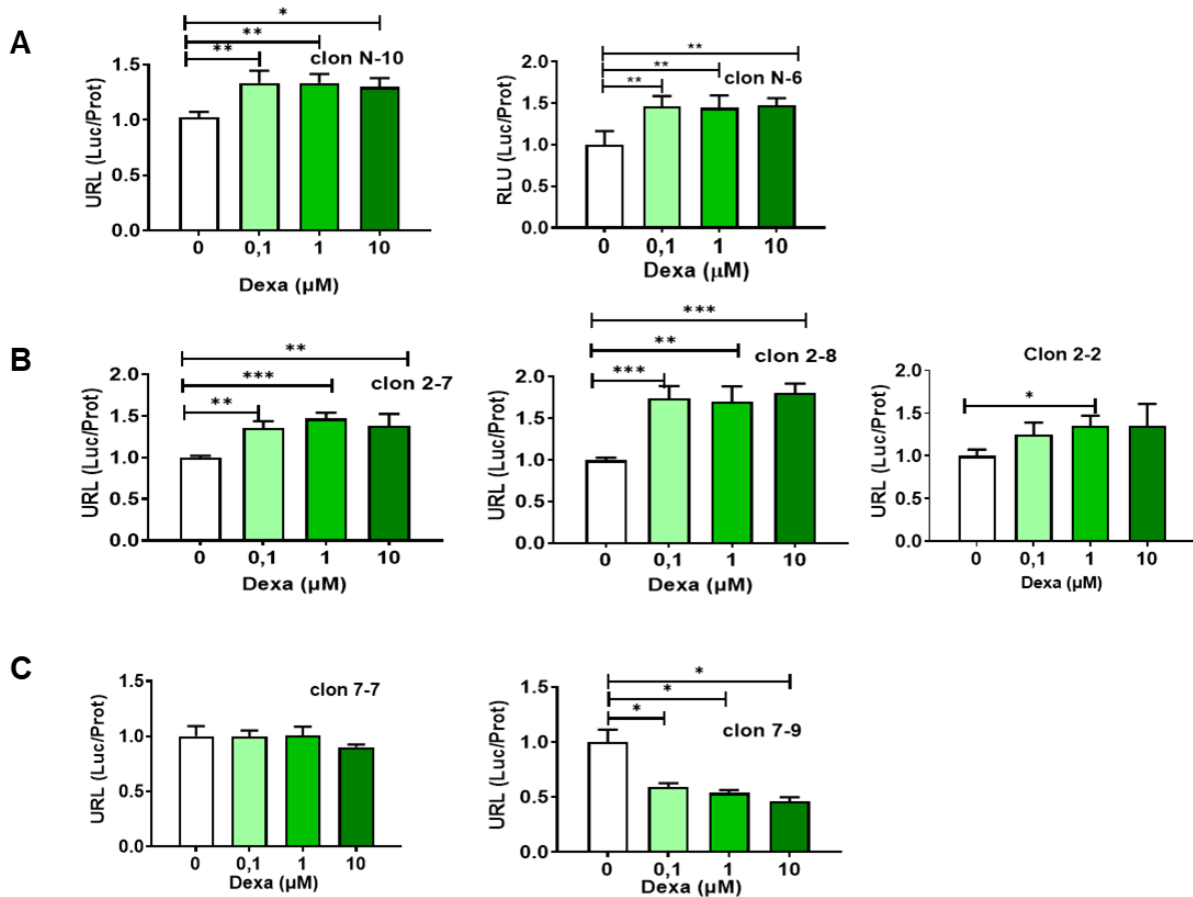


Figura 13. Análisis de la inducción por dexametasona de clones estables con promotores que poseen GRE. Se analizó inducción por dexametasona de clones provenientes de células CHO-K1 transfectada con los promotores RegCG/GRE/CMV, RegCG/GRE/Enh/GRE/Core y RegCG/CMV en cultivos en adherencia en placas de 24 pocillos con 500 μ L de medio. Las células fueron estimuladas 24 horas post inoculación a concentraciones crecientes de dexametasona (0; 0,1; 1 y 10 μ M) y se midió la actividad luciferasa 48 horas después del estímulo. Las gráficas muestran la actividad luciferasa (URL) de clones que responden a la estimulación con dexametasona de diez clones analizados para cada promotor; A) dos clones respondedores para RegCG/GRE/CMV, B) tres clones respondedores para RegCG/GRE/Enh/GRE/Core. Además, en C) se muestran dos clones representativos de clones no inducibles para el control sin GRE, RegCG/CMV, donde uno no responde (gráfico de la izquierda) y otro es reprimido en presencia de dexametasona (gráfico de la derecha) La gráfica es representativa de experimentos con tres puntos por medición (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Para buscar las mejores condiciones de inducción con dexametasona, se realizó la caracterización del crecimiento de un clon y se relacionó con los niveles de producción de anticuerpos (Figura 14B). De acuerdo con esta curva, al realizar un inóculo de 200.000 células/mL, las células alcanzan un 100% de confluencia a las 48 horas de cultivo llegando a alrededor de 750.000 células/mL, las que siguen proliferando hasta alrededor de $2,5 \times 10^6$ células/mL a las 120 horas desde la confluencia. Después de las 120 horas la concentración de células vivas comienza a disminuir. De acuerdo con esta curva se propuso estudiar el efecto de la estimulación con dexametasona a 0; 0,8; 3,2 y 12 μM , en diferentes tiempos del cultivo, estableciendo una estimulación temprana a las 48 horas y una estimulación tardía a las 96 horas, midiendo la concentración de anticuerpos a las 144 horas.

Como se observa en la figura 14C, el clon G54 muestra una respuesta a dexametasona diferencial entre estimulación temprana y tardía. Así al estimular tempranamente (48h) se observó un efecto represor de la producción de manera dosis dependiente a partir de una concentración de dexametasona de 3,2 μM . Sin embargo, al estimular tardíamente (96h) se observó un aumento de la producción dosis dependiente a concentraciones de 3,2 y 12,8 μM de dexametasona, aumentando en un 48% a la dosis más alta utilizada respecto al control sin estímulo.

Estos resultados muestran que la dexametasona ejerce un efecto mixto sobre la productividad de los clones con los promotores híbridos que contienen GRE. Por un lado, se observó en algunos clones un efecto inductor de la actividad dosis dependiente de dexametasona, mientras en otros clones se observó efectos inhibitorios. Una posible explicación es que dexametasona inhiba el crecimiento celular, por lo cual, al estimular tempranamente las células no alcanzarían la masa celular suficiente para lograr un nivel de producción alto. Bajo este panorama la inducción tardía del cultivo, cuando ya se ha alcanzado una masa suficiente de células puede permitir aumentar la producción respecto a los cultivos sin estímulo. Otras alternativas posibles serán planteadas en la discusión.

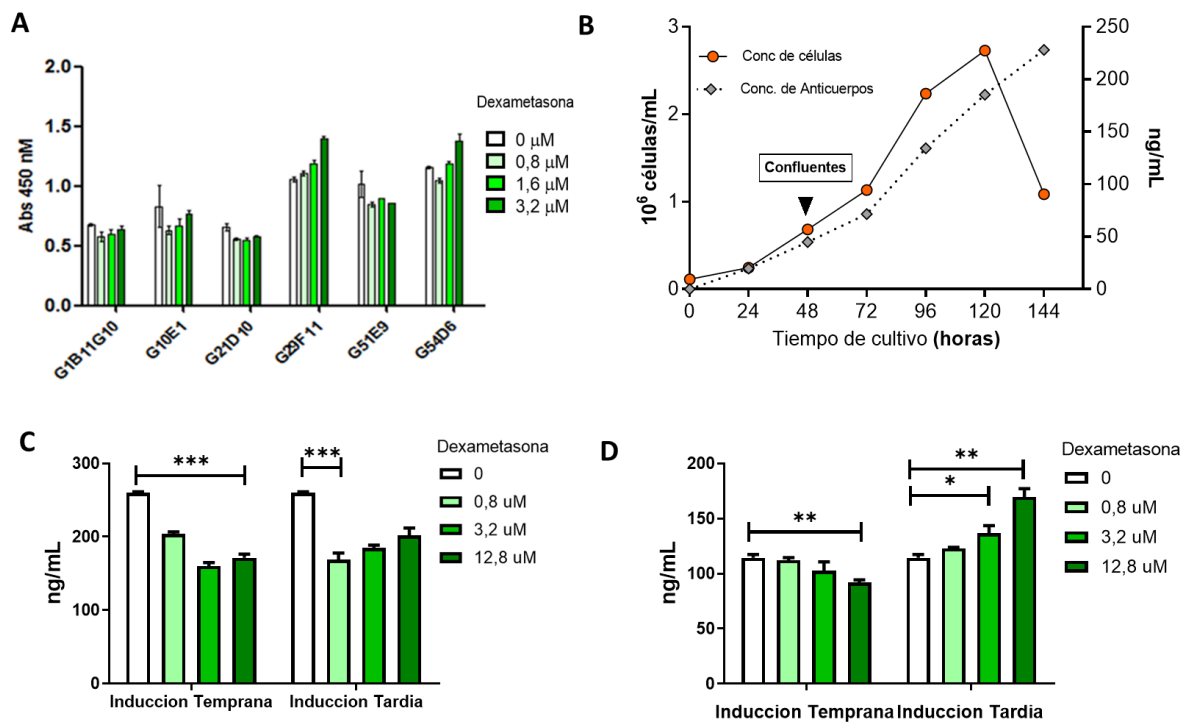


Figura 14. Clones estables con vector pRegCG/GRE/CMV-aCD20HL son sensibles a dexametasona. **A)** ensayo de inducción temprana con dexametasona y análisis de la producción de anticuerpo recombinante a las 48 horas de clones que contienen el vector pOpt-aCD20HL, donde la producción fue determinada mediante ELISA y expresada en forma relativa por absorbancia. **B)** curva de crecimiento celular y producción de anticuerpo recombinantes de un clon productor que contiene pOpt-aCD20HL y pCMV-aCD20HL. Sat (48h), indica el momento en que las células llegan a confluencia. **C)** ensayo de inducción temprana (48h) y tardía (96h) de un clon que contiene pOpt-aCD20HL y medición de producción en la fase terminal del cultivo (144h), donde la producción fue determinada mediante ELISA y expresada en concentración de anticuerpo. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

OE3. Generar un promotor resistente al silenciamiento génico

A3.1: Evaluando el silenciamiento génico en un sistema reportero de la actividad transcripcional de líneas estables bajo el control de promotores híbridos

Para probar el efecto de RegCG en el silenciamiento del promotor CMV, se evaluó la actividad de los promotores RegCG, RegCG/CMV, RegCG/GRE/CMV, RegCG/Enh/GRE/Core y RegCG/GRE/Enh/GRE/Core en un sistema reportero de la transcripción clonando estos promotores en el vector reportero pGL4.17 y midiendo su actividad en líneas estables de células CHO-K1, usando como patrón de comparación la actividad del promotor CMV. Líneas celulares CHO-K1 transfectadas en forma estable y selección de clones por dilución limitante, se cultivaron en presencia del antibiótico de selección hasta que se estableció el cultivo, después de lo cual se eliminó el selector para permitir el libre silenciamiento del gen recombinante.

Para determinar las condiciones del análisis de la actividad de los promotores, previamente se analizó la disminución de la actividad del promotor de CMV en el tiempo después de la retirada del antibiótico de selección (Figura 15A). Este análisis reveló el decaimiento continuo de la actividad de CMV estabilizándose en alrededor de un 10% de la actividad inicial luego de 40 días de cultivo. De acuerdo a este resultado, se definió 40 días como periodo de estabilización de los clones de cultivo, utilizando este tiempo para comprar el efecto del silenciamiento en los distintos promotores en relación a sus niveles de actividad transcripcional.

Para determinar la resistencia al silenciamiento de los diferentes promotores respecto al promotor CMV, se seleccionaron al azar 16 clones de cada transfección y se cultivaron hasta el día 39 después de la eliminación del antibiótico de selección. Al final de periodo de cultivo, se analizó la actividad reportera de cada clon y se compararon con la actividad de los clones que portaban el promotor CMV (Figura 15B). Los resultados mostraron que los clones que portaban el promotor RegCG tenían en promedio 3 veces más actividad que los clones que portaban el promotor CMV, lo que indica que el promotor RegCG es más resistente al silenciamiento transcripcional que el promotor CMV. A su vez, los clones con el promotor híbrido RegCG/CMV excedieron 15 veces la actividad promedio de los clones que portaban el promotor CMV, lo que sugiere que la porción RegCG está contribuyendo en reducir el silenciamiento de este promotor híbrido. El segundo promotor más activo fue

RegCG/GRE/CMV, cuyos clones alcanzaron un aumento de 6 veces en la actividad en comparación con los clones CMV.

Aunque los promotores híbridos en los que el CMV estaba interrumpido por la inserción de un tándem de GRE tenían menos actividad transcripcional que RegCG en ensayos de expresión transiente (Figura 10C), sorprendentemente, en clones estables mostraron actividades similares con respecto a RegCG (Figura 15B). Esto es concordante con los resultados de RT-PCR que muestran que RegCG mantiene la actividad transcripcional en el contexto del promotor híbrido RegCG/GRE/CMV, sugiriendo además que su actividad no es inhibida por los otros elementos del promotor híbrido (GRE y/o CMV).

Junto a lo anterior, dado que las actividades de los clones con promotores híbridos fueron mayores que la actividad de clones con el promotor CMV se puede interpretar que RegCG está dando a los promotores híbridos la capacidad de ser más resistentes al silenciamiento. Asimismo, el hecho que la actividad de los clones híbridos sea mayor que de clones con RegCG indican que la porción CMV de los promotores híbridos mantiene y aporta actividad transcripcional al promotor. Por lo cual, estos resultados muestran que RegCG y CMV pueden funcionar conjuntamente en los promotores híbridos, produciendo un efecto aditivo de actividad transcripcional al final del periodo de estabilización de los clones.

A3.2: Evaluando el decaimiento de la producción de anticuerpos recombinantes de líneas estables bajo el control de promotores híbridos

Para probar la capacidad de los promotores híbridos que contienen RegCG en la producción de anticuerpos recombinantes se expresó un anticuerpo quimérico anti-CD20 humano en células CHO usando un sistema de expresión bicistrónico. Los promotores RegCG/CMV y RegCG/GRE/CMV se seleccionaron debido a que mostraron la mayor actividad transcripcional con el sistema reportero de la transcripción en clones estables. Los vectores bicistrónicos se construyeron reemplazando el gen de la luciferasa en los vectores reporteros que contienen los promotores respectivos con los genes de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo anti-CD20 (anti-CD20-H y anti-CD20-L, respectivamente) separados por un sitio IRES (Figura 16A). Líneas celulares CHO-K1 estables se generaron mediante transfección con vectores de expresión bajo el control de los promotores híbridos RegCG/CMV, RegCG/GRE/CMV y el promotor CMV, respectivamente.

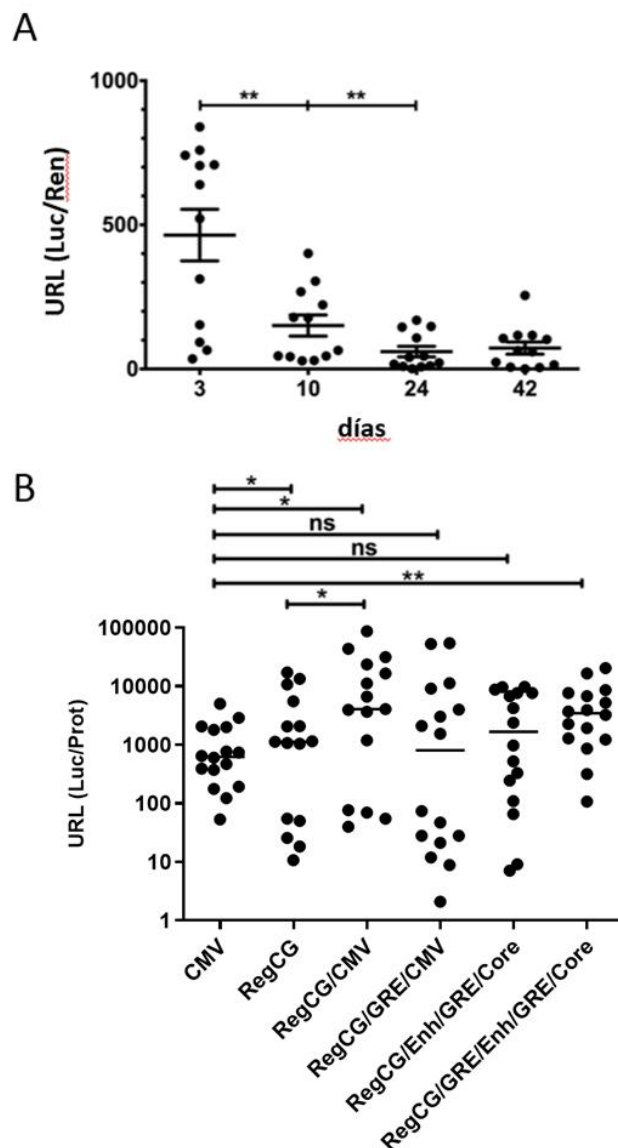


Figura 15. Los promotores que contienen RegCG son resistentes al silenciamiento en líneas celulares estables. Actividad transcripcional en líneas estables de células CHO-K1 transfectadas con los vectores informadores y clonadas por dilución limitante. La actividad de los promotores se expresó en unidades relativas de luminiscencia (RLU) calculada como la relación entre la luminiscencia y la concentración de proteínas totales en los lisados celulares. En **A**) la disminución de la actividad del promotor de CMV en un grupo de clones se muestra hasta 41 días después de la eliminación de la presión de selección. En **B**) la actividad de los promotores pGL-CMV, pGL-RegCG, pGL-RegCG/CMV, pGL-RegCG/GRE/CMV, pGL-RegCG/Enh/GRE/Core, pGL-RegCG/GRE/Enh/GRE/Core de un grupo de clones elegidos al azar en el día 39 después de la selección se retiró (n = 16). Los datos se presentan como valores medios \pm S.D. La prueba t no pareada de dos colas se utilizó para el análisis estadístico. (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001).

Cincuenta y seis clones de cada construcción se recolectaron aleatoriamente y se cultivaron en ausencia de antibióticos de selección durante un período de aproximadamente 40 días para permitir su silenciamiento, según el tiempo determinado previamente para el promotor CMV usando el sistema reportero de la transcripción (Figura 15A). Al final del periodo de cultivo se determinó la concentración de anticuerpos en el sobrenadante para cada clon, las que se muestran en el gráfico de la figura 16B, el cual incluyó 30 clones de CMV, 39 clones de RegCG/CMV y 40 clones de RegCG/GRE/CMV. Para el resto de los clones seleccionados no se detectó anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo por lo cual se consideró que eran clones no productores. Los resultados del promedio de producción de los clones mostraron que los clones con los promotores RegCG/CMV y RegCG/GRE/CMV tenían 4 veces mayor producción que los clones con el promotor CMV (Figura 16B). La misma diferencia se observó al analizar el promedio de producción de los 5 mejores clones de cada construcción (datos no mostrados). No se encontraron diferencias estadísticas en la producción promedio de los clones de los promotores RegCG/CMV y RegCG/GRE/CMV, lo que indica que la inserción del tándem de GREs entre RegCG y CMV, no afecta drásticamente la actividad del promotor híbrido en líneas estables.

Por lo tanto, estos resultados confirman que la combinación de RegCG y CMV hace posible obtener clones que aumentan significativamente la producción de proteínas recombinantes después de un período de estabilización de los clones recombinantes.

A3.3 Evaluando la capacidad de generar clones estables de alta producción con el promotor híbrido

Para probar la capacidad del promotor RegCG/GRE/CMV de generar clones de alta producción de anticuerpos, se utilizaron células CHO DG44 deficientes en el gen *dhfr*, las que se co-transfectaron con vectores de expresión que codifican separadamente la cadena liviana y la pesada de un anticuerpo recombinante anti-TNF humano, ambos controlados por el promotor RegCG/GRE/CMV (Figura 17A). El vector de la cadena liviana contenía como sistema de selección el gen de *dhfr* y el vector de la cadena pesada contenía el gen de resistencia a la G418.

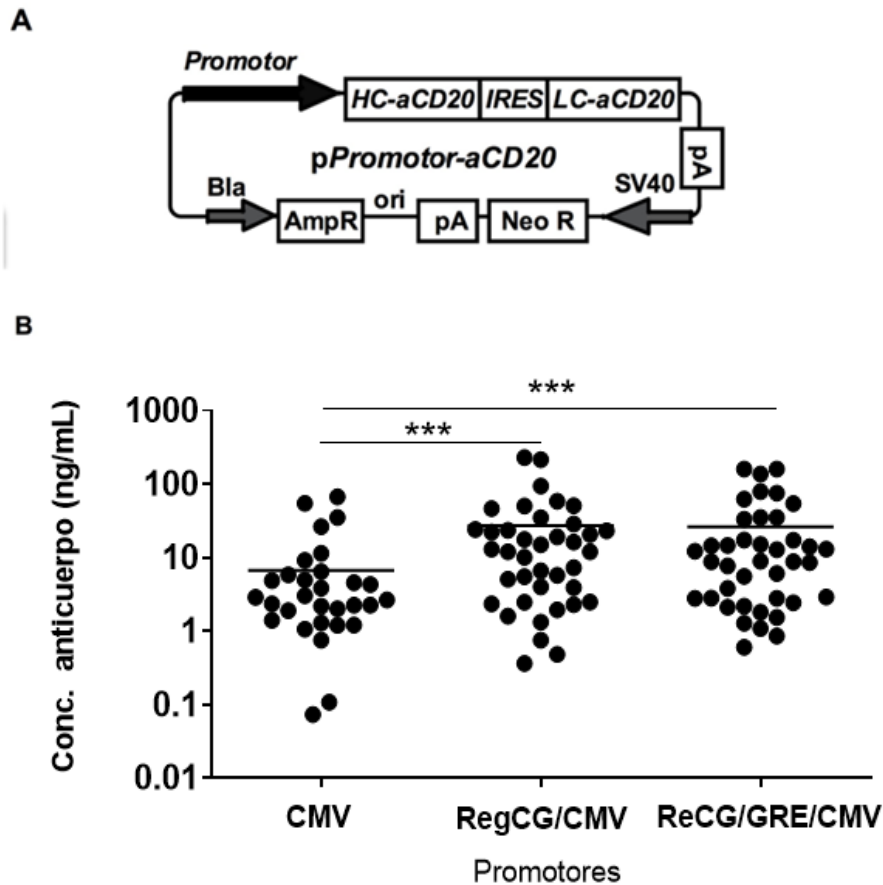


Figura 16. Los promotores que contienen RegCG aumentan los niveles de producción de un anticuerpo anti-CD20 en células CHO-K1. Células CHO-K1 transfectadas con los vectores pRegCG/GRE/CMV-aCD20, pRegCG/CMV-aCD20 y pCMV-aCD20 se clonaron por dilución limitante y se cultivaron durante 35 días después de la eliminación del antibiótico de selección, luego de lo cual se midió la concentración anticuerpos de los sobrenadantes de los clones, determinados mediante un ensayo ELISA. **A)** Representación esquemática de promotores recombinantes clonados en un vector biscistrónico para expresar un anticuerpo humano anti-CD20. **B)** Concentración promedio de anticuerpos (señaladas por una barra horizontal) de grupos de 30, 39 y 40 clones, respectivamente para tres promotores diferentes: CMV: 6,2 ng/mL, RegCG/CMV: 25,3 ng/mL y RegCG/GRE/CMV: 24,3 ng/mL. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA), seguida de la prueba de Dunn. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

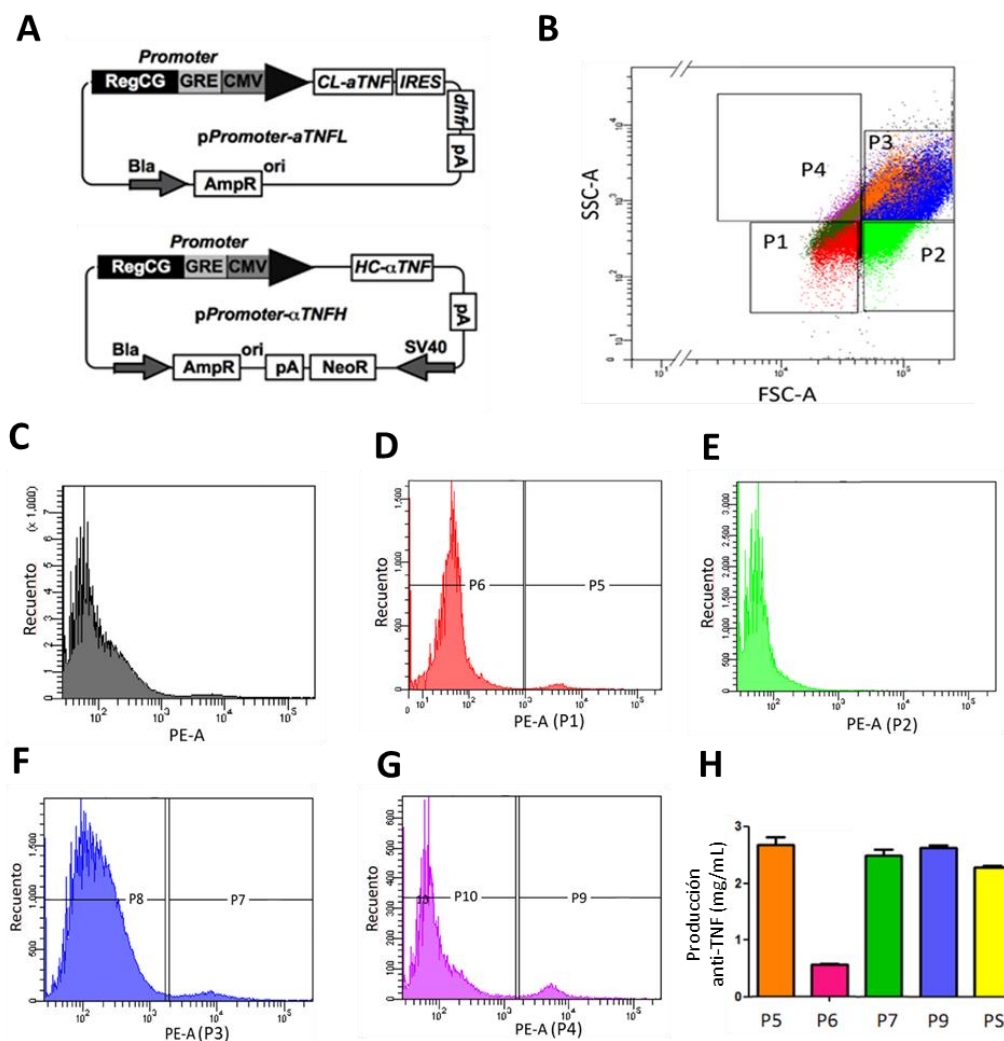


Figura 17. Estrategia de selección de poblaciones celulares de células CHO-DG44, transfectadas con genes codificantes de un anticuerpo anti-TNF humano, estables por *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS). **A)** representación esquemática de los vectores para expresar un anticuerpo humano anti-TNF humano. **B)** distribución de una población de células provenientes de una amplificación génica con metotrexato (500 nM) incubadas a 4°C con un anticuerpo policlonal anti-Fc de cadena gamma de inmunoglobulina humana conjugado a ficoeritrina (PE) y división de células en cuatro grupos de células (P1, P2, P3 y P4) según SSC-A y FSC-A, de los cuales cada grupo se subdividió en dos subgrupos de acuerdo con su alta o baja fluorescencia. **C)** distribución de células totales según fluorescencia. **D) a G)** separación de subgrupos de alta y baja señal de fluorescencia, donde en E, no se subdividió debido al bajo número de células de alta fluorescencia. **H)** análisis de producción de anticuerpos obtenida de cultivos derivados de los subgrupos P5, P6, P7 y P9, incluyendo células no sorteadas (PS, pre sorter).

Para seleccionar clones de alta producción de anticuerpo, se utilizó como estrategia la transfección e inducción de la amplificación génica con metotrexato seguida de un enriquecimiento poblacional de las células de mayor producción mediante *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) (ver materiales y métodos). Para el enriquecimiento por FACS se utilizaron células de la población de células producto de la amplificación génica con metotrexato (500 nM) (ver materiales y métodos) marcándolas con un anticuerpo policlonal anti-Fc de cadena gamma de inmunoglobulina humana, conjugado a ficoeritrina (anti-Fc-PE), incubándolas en hielo por 30 min y lavándolas con PBS antes de ser sometidas a FACS. Se clasificaron en 4 grupos poblacionales (gates; P1, P2 P3 y P4) según sus niveles de alta o baja granularidad (SSC-A) y tamaño (FSC-A) (Figura 17B), donde cada uno de estos grupos se subdividieron en dos subgrupos de alta y baja fluorescencia. De este modo se aislaron los siguientes subgrupos: P5 (células con alta señal derivadas de P1), P6 (células con baja señal derivadas P1) (Figura 17D), P7 (células de alta señal derivadas de P3) (Figura 17F) y P9 (células de alta señal derivadas de P4) (Figura 17G). Para el grupo P2 se detectaron muy baja cantidad de células con alta fluorescencia por lo que no se aislaron células (Figura 17E). Se aisló el subgrupo P6 para comparar subgrupos de alta y baja señal fluorescencia. Finalmente, las poblaciones de células aisladas de cada subgrupo se expandieron y sembraron a un inóculo de 300.000 células/mL en 30 mL de medio en matraces en cultivo en suspensión y a los 7 días se evaluó la producción de anticuerpo por ELISA (ver materiales y métodos). Se observó que los cultivos de los subgrupos de alta fluorescencia P5, P7 y P9 mostraron mayor producción que la del subgrupo de baja fluorescencia P6 (Figura 17H). Posteriormente, las células de la población enriquecida se sembraron en medio semisólido (ver materiales y métodos) y se cultivaron durante 15 días, luego las colonias visibles se aislaron manualmente mediante aspiración con una micropipeta y se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos, colectando aproximadamente 600 clones. Los clones fueron escalados a volúmenes mayores de cultivo pasando de placas de 96 pocillos a placas de 6 pocillos, pasando finalmente a matraces Erlenmeyer con 25 mL de medio continuando su cultivo en suspensión. En cada paso de la escalada se seleccionaron los mejores clones productores por su nivel relativo de producción determinado por ELISA. En la figura 18 se muestra el paso de selección intermedia de clones desde placas de 96 pocillos a placas 6 pocillos, desde donde se seleccionaron 7 clones que mostraron una productividad igual o superior a 2 pg/célula/día y donde el clon 7 mostró mayor productividad, por lo cual fue seleccionado para la última etapa de escalamiento (Figuras 19A a C).

El escalado final del clon 7 se realizó en un cultivado en frasco Spinner con 60 mL de medio, mantenido durante 17 días. El análisis de producción del anticuerpos anti-TNF mostró una producción máxima de 132 mg/L alcanzada a los 13 días de cultivo cuando las células tenían una viabilidad superior al 60%, luego de lo cual se observó rápidamente decaimiento de estas. La productividad calculada para este clon fue de 2 pg/célula/día (Figuras 19D a F).

Por lo tanto, considerando la obtención de 7 clones con productividad de 2 pg/célula/día desde 600 clones aislados inicialmente se logró generar clones de alta productividad en una proporción de 1 en 85 clones seleccionados inicialmente.

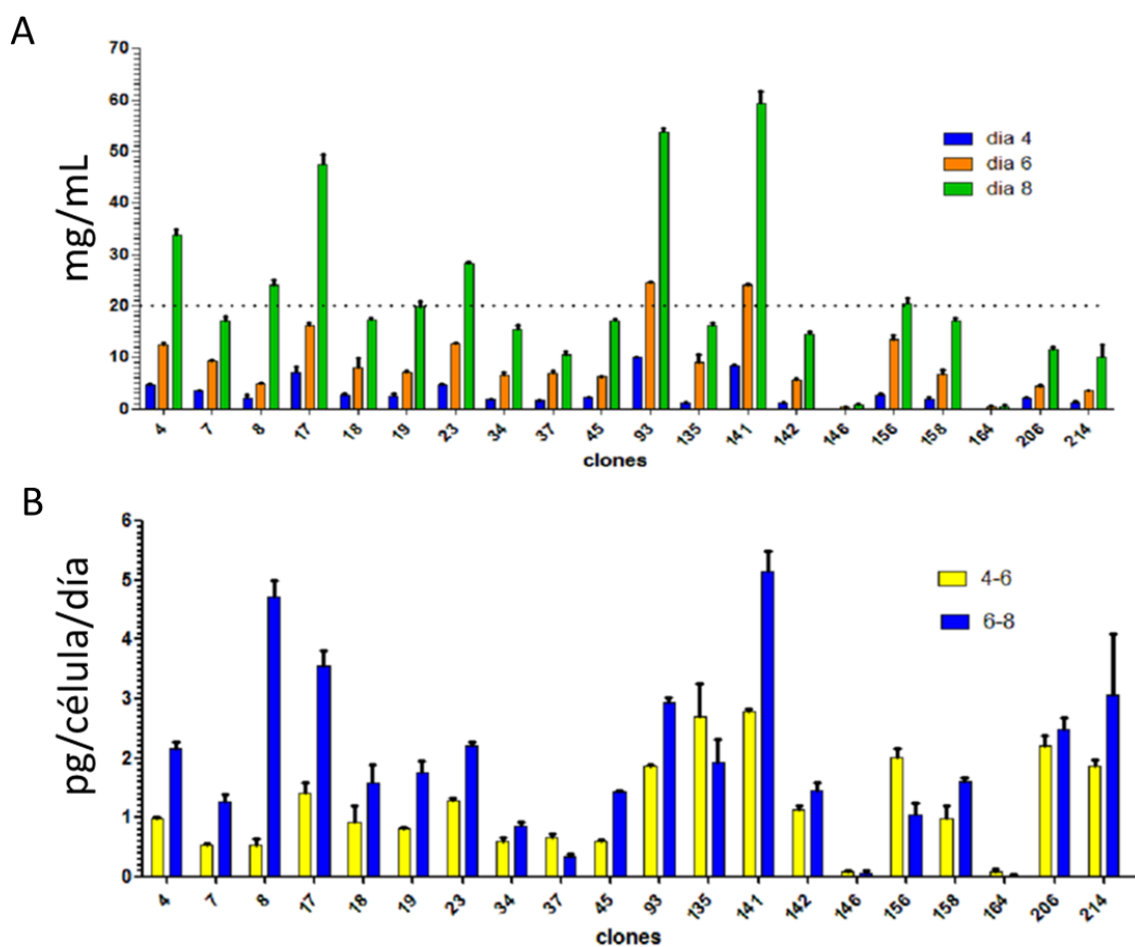


Figura 18. Selección de clones de células CHO-DG44 transfectadas con genes codificantes de un anticuerpo anti- α TNF. 30 clones, preseleccionados por su producción relativa de anticuerpo en cultivos estáticos en placas de 96 pocillos, se cultivaron en suspensión en placas de 6 pocillos con 3 mL de medio CD OptiCHO con agitación a 140 rpm. **A)** Concentración de anticuerpo anti-TNF humano, determinada por ELISA, desde los sobrenadantes de cultivo de cada clon, en los días 4, 6 y 8. **B)** Productividad específica de anticuerpo, calculada para cada clon entre los días 4 y 6 y entre los días 6 y 8.

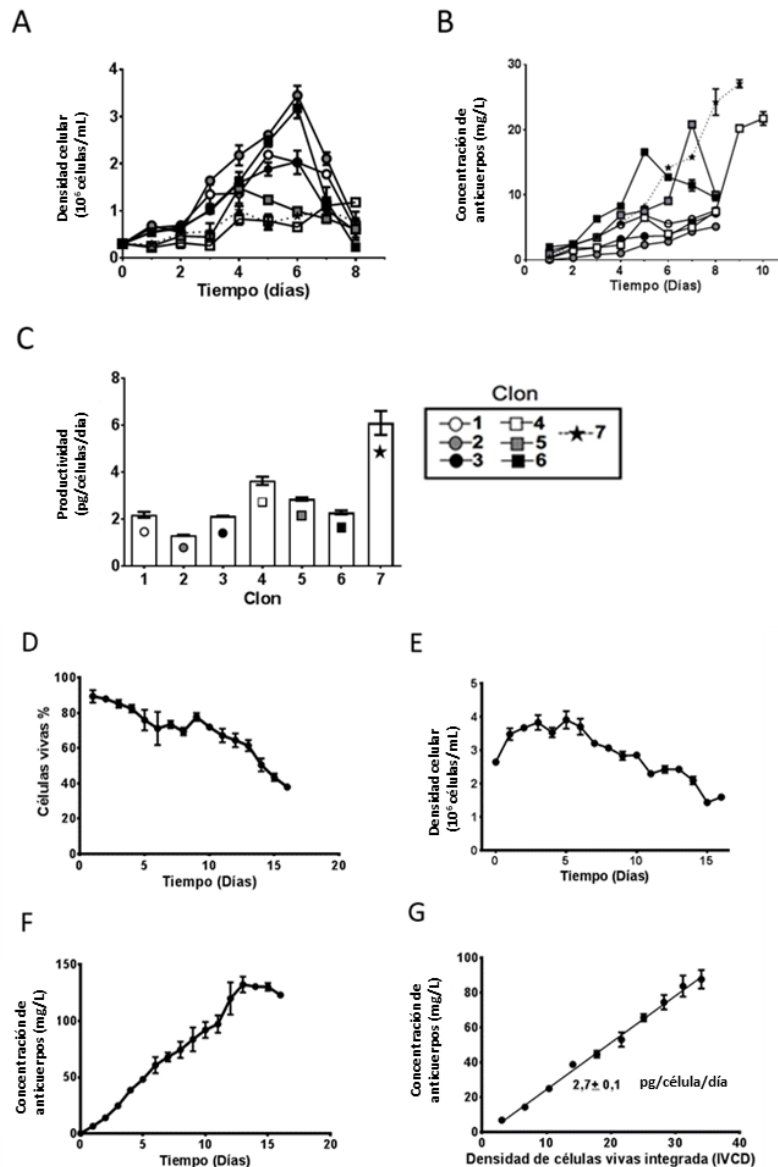


Figura 19. Producción de un anticuerpo recombinante en células CHO DG44 con un promotor que contiene RegCG. Las células CHO DG44 se cotransfectaron con vectores que expresan un anticuerpo anti-TNF bajo el control del promotor híbrido RegCG/GRE/CMV, sometidos a amplificación genética por metotrexato. **A-C)** Selección de clones proveniente de las poblaciones de células con mayor producción de anticuerpos aisladas por FACS. Los clones se sembraron en medio semisólido, se cultivaron en placas de 96 pocillos y se analizó su producción volumétrica de anticuerpos mediante ELISA. Se muestra la producción volumétrica de anticuerpos, la viabilidad y la productividad específica de los 7 clones de mayor producción cultivados en matraces de 125 mL. **D-G)** Caracterización del clon con el nivel de producción más alto (número de clon 7), cultivadas en una botella Spinner. Representación gráfica de la densidad celular, la viabilidad, la producción volumétrica y la productividad específica.

Discusión

La isla de CpG

La comprensión del funcionamiento de los promotores de genes *housekeeping* aún es motivo de gran investigación. Sin bien se han realizado grandes avances, aún no está completamente comprendido el por qué estos son refractarios al silenciamiento transcripcional. Sin embargo, se ha evidenciado que las islas CpG juegan un papel preponderante en esta propiedad. La identificación de estas islas mediante predicción computacional ha permitido utilizar estos elementos genéticos para estudiar sus propiedades, como para mejorar la resistencia al silenciamiento transcripcional de promotores recombinantes.

En esta tesis se estudió la capacidad de una isla CpG, identificada por predicción en la región promotora del gen *ACTB* de *Cricetulus griseus*, de mejorar la actividad del promotor CMV para aumentar la producción de proteínas recombinantes en células CHO en líneas estables. La región del promotor que contiene esta isla CpG, que se denominó RegCG, incluyó el promotor proximal, primer exón y primer intrón del promotor ACTB.

Otros autores han estudiado la capacidad del promotor ACTB de otras especies para mejorar la expresión de genes recombinantes. Por ejemplo, Damdindorj y cols. describieron una porción mínima del promotor de ACTB humano que es capaz de mantener la expresión en líneas celulares estables durante más de 70 días. Esta porción incluye el *enhancer* en la región 5' del promotor y el promotor proximal donde se encuentran las cajas CAAT, CArG y TATA hasta aproximadamente 30 pb del primer exón; sin embargo, a diferencia de este trabajo, no incluye el primer intrón (Damdindorj y cols., 2012).

Otro ejemplo es el promotor CAG, un promotor que combina parte del promotor de ACTB de pollo en el cual se reemplaza la región 5' del promotor (*enhancer* del promotor ACTB) por el *enhancer* del promotor CMV ubicado río arriba (Damdindorj y cols., 2012). La parte del promotor ACTB incluye el promotor proximal, el primer exón, incluye una gran parte del primer intrón del gen *ACTB*, similar a este trabajo, pero es seguido por el aceptor de corte y empalme de un intrón gen de globina β de conejo (Miyazaki y cols., 1989; Niwa y cols., 1991). Este ha sido eficiente en la expresión estable de transgenes en células HEK293 (Dou y cols., 2021).

Debido a que RegCG contiene el promotor proximal del promotor ACTB, primero se evaluó la capacidad de este fragmento de actuar como promotor, comprobando que RegCG por

sí mismo se comporta como un promotor activo. Pese a carecer de un *enhancer* RegCG mostró una potencia de un 40% respecto al promotor CMV.

Junto a lo anterior, mediante análisis de RT-PCR, se comprobó que la porción RegCG del promotor híbrido RegCG/GRE/CMV era transcripcionalmente activa. Aquí se detectó que la transcripción se inicia mayoritariamente dentro del intrón de RegCG y en menor medida en el TSS proximal (Figura 12C). Así, el comportamiento de la porción RegCG es diferente al comportamiento del promotor ACTB endógeno, donde el TSS proximal es el principal responsable de la actividad transcripcional, similar a otros promotores ACTB (Danilition y cols., 1991). Es de suponer que en el promotor RegCG la iniciación de la transcripción es similar a la observada en el promotor RegCG/GRE/CMV, sin embargo, esto es algo que habría que comprobar estudiando el promotor RegCG en forma independiente.

Un ejemplo de inicio de transcripción intrónica en promotores de ACTB había sido informado por Feng y cols., 2006, quienes encontraron una isoforma alternativa de expresión embrionaria de este gen en anfibio chino, un modelo animal de morfología similar a la de los vertebrados, pero mucho más simple (Li y cols., 2013). Sin embargo, la transcripción de esta isoforma está comandada por sus propios elementos CAAT, CArG y TATA que están presentes dentro del intrón I (Feng y cols., 2014). Si bien, es sabido que genes *housekeeping* frecuentemente tienen TSS intrónicos, los cuales frecuentemente no están comandados por la caja TATA (Mahpur y cols., 2018), el análisis de la actividad reportera de la mutante RegCGdel, que carece de las cajas CAAT y CArG del promotor proximal, (Figura 3A y 5B) hace pensar que el TSS intrónico de RegCG es dependiente del promotor proximal.

Por otro lado, las cajas CArG son elementos conservados en el primer intrón de ACTB de mamíferos (Danilition y cols., 1991; Shen y cols., 2011), lo que posiblemente tienen una función en la actividad del TSS intrónico (Liu y cols., 1990). De acuerdo con el análisis de RT-PCR, la caja CArG del intrón de RegCG está ubicado río abajo del TSS intrónico (Figura 6C) y contiene una mutación que cambia una T para una C (Figura 3). Determinar si la iniciación de la transcripción intrónica de RegCG depende de las cajas TATA o CArG intrónica podría ser estudiado mediante análisis de RT-PCR usando el promotor RegCG; mutando o eliminando estas cajas.

La evidencia reciente muestra que existe coordinación entre el *splicing* de intrones, la maquinaria de transcripción y el estado de la cromatina (Neves y cols., 2017; Shaul, 2017), pudiendo la presencia de intrones aumentar la transcripción de algunos genes (Bieberstein y cols., 2012). Los ensayos de RT-PCR también sugirieron que existiría iniciación de la

transcripción a partir del TSS proximal, sin embargo, este es de menor intensidad. Por otro lado, la longitud de amplicón detectado indica que este transcrito no sufre *splicing*. Sería posible que la recuperación de la capacidad de *splicing* del primer intrón de RegCG, en forma similar a lo realizado con el promotor CAG donde se reemplazó el aceptor del primer intrón por un aceptor de un intrón gen de globina β de conejo (Kosuga y cols., 2000), pudiera favorecer el inicio de la transcripción a partir del promotor proximal y aumentar la actividad de RegCG.

Por otro lado, los TSS intrónicos de algunos genes se activan independientemente de que ocurra el proceso *splicing* y dependen de la secuencia de ADN (Gallegos y Rose, 2015, 2017). En estos, las características de la secuencia del intrón induciría una conformación nucleosomal que haría que esta región fuese más accesible a la maquinaria de transcripción (Gallegos y Rose, 2015). Curiosamente, estas características también se han atribuido a las islas CpG, donde los promotores desmetilados tienen una región libre de nucleosomas que rodea el TSS, que la haría intrínsecamente accesible sin la necesidad de un cambio de nucleosoma dependiente de ATP (Deaton y Bird, 2011; Ramirez-Carrozzi y cols., 2009; Schones y cols., 2008). Por lo tanto, el inicio de la transcripción dentro del intrón de RegCG, la que ocurre sin *splicing*, es concordante con la idea de que la secuencia nucleotídica intrínseca de la isla CpG es la responsable de inducir la actividad promotora de RegCG. Por lo cual, la ventaja o desventaja de recuperar la capacidad de *splicing* del intrón de RegCG no es fácil de predecir y finalmente tendría que ser probado.

Finalmente, RegCG demostró ser un promotor por sí mismo, que, aunque es menos potente que el promotor CMV, es más resistente al silenciamiento. Por tal motivo, este pudiera ser utilizado para la expresión de transgenes que no requieren alto nivel de expresión, pero sí que sean más estable en el tiempo. Por ejemplo, en terapia génica, en donde el silenciamiento de genes transgénicos es un problema habitual (Bestor, 2000; Swindle y cols., 2002).

Silenciamiento de promotores híbridos

El planteamiento inicial de esta tesis se basó en la hipótesis de que la isla CpG podía disminuir el silenciamiento del promotor CMV. Por lo cual, el comportamiento de RegCG como un promotor inevitablemente cambia la forma de evaluar el efecto de la combinación de RegCG con el promotor CMV. El silenciamiento de los promotores fue determinado en base a la comparación de la actividad final de los clones ya estabilizados, por lo cual solo se puede

evaluar el efecto final sobre el silenciamiento de los promotores híbridos y no la contribución particular de las porciones RegCG y CMV.

La inserción de RegCG río arriba del promotor CMV, para generar los promotores híbridos RegCG/CMV y RegCG/GRE/CMV, resultó en la generación de clones que una vez estabilizados tenían mayor actividad que los clones generados con los promotores de CMV y RegCG por separado. La producción del anticuerpo anti-CD20 excedió cuatro veces la producción promedio de los clones desarrollados con el promotor CMV. Estos aumentos fueron similares a los reportados por Betts y Dickson, 2015, quienes incorporaron un UCOE río arriba de CMV y lo compararon con el promotor CMV (Betts y Dickson, 2015).

Así, el hecho que el promotor híbrido tenga mayor actividad que RegCG hizo evidente que la porción de CMV de los promotores híbridos mantiene actividad transcripcional en clones estabilizados. Por lo cual se propone que la actividad de los promotores híbridos se debe a un efecto aditivo entre la actividad de RegCG y CMV. Además, dado que en ensayos de actividad reportera en clones estables el promotor RegCG mostró mayor actividad que el promotor CMV, se puede suponer que la actividad final de los promotores híbridos se debe mayoritariamente a la porción RegCG.

Sin embargo, de acuerdo con nuestro planteamiento inicial, también es posible que la actividad final de los promotores híbridos se deba a que la porción RegCG este ayudando a la porción CMV a adquirir más resistencia al silenciamiento, así el aporte final de la porción CMV sería mayor a la actividad observada con el promotor CMV en clones estabilizados. Evidencias en tal sentido pueden ser obtenidas del trabajo de William y cols. quienes utilizaron una configuración de promotor parecida a la utilizada en esta tesis, donde un UCOE fue incorporado corriente arriba del promotor CMV. Estos autores demostraron que el UCOE fue capaz de disminuir el silenciamiento del gen recombinante con el consiguiente aumento en la producción de proteínas recombinantes (Williams y cols., 2005). Sin embargo, en esta tesis no se midió la actividad transcripcional individual de la porción CMV de los promotores híbridos, por lo cual no se pudo comparar su tasa de decaimiento con la del promotor CMV. Así, para medir específicamente el efecto de la presencia de la porción RegCG sobre la resistencia al silenciamiento de la porción CMV en los promotores híbridos se podrían realizar ensayos transcripción reversa y cuantificación por Real Time PCR (RTqPCR), donde se cuantificaría el mensajero río arriba del TSS proximal de la porción CMV (que sería producto del TSS intrónico) y se compararía con el mensajero cuantificado río debajo del TSS de CMV (que sería producto de la suma de la actividad del TSS intrónico y del TSS de CMV). Esto permitiría

evaluar si existe dependencia en la tasa de silenciamiento de la porción CMV respecto al silenciamiento de RegCG.

También sería posible comparar la metilación de ADN del promotor CMV y la porción CMV de los promotores híbridos en los clones estabilizados para ver si la presencia de RegCG disminuye la metilación de la porción CMV. Sin embargo, Brendel *et al.*, demostraron que el UCOE no protege al promotor viral de la metilación (Brendel y cols., 2012).

Los resultados de la potencia de un promotor se obtienen con frecuencia en ensayos de expresión transitoria (Brown y cols., 2014; Liu y cols., 2016)); sin embargo, esto no siempre refleja lo que sucede en líneas celulares estables. En nuestros ensayos, el promotor de CMV mostró la mayor actividad con respecto a RegCG y las otras construcciones probadas que combinaron RegCG con CMV. Por lo tanto, ninguna de las modificaciones al promotor de CMV genera un promotor con mayor actividad que la del promotor de CMV no modificado. Sin embargo, el análisis de la actividad del promotor en líneas estables mostró que todas las líneas celulares generadas con promotores que contienen RegCG tenían actividad más alta que con el promotor de CMV. Dado el drástico descenso de la actividad del promotor CMV, probablemente después de este período de estabilización cualquier factor que disminuya el silenciamiento del promotor se reflejará en un aumento significativo en la productividad de los clones. Por lo tanto, la evaluación de los promotores que se utilizarán en líneas celulares para producir proteínas recombinantes debe llevarse a cabo en ensayos con clones ya estabilizados para considerar el efecto del silenciamiento sobre ellos.

Otro resultado a resaltar es que el promotor híbrido RegCG/GRE/CMV demostró ser compatible con el sistema de amplificación génica basado en el uso de células CHO DG44 (*dhfr*⁻). Esta técnica fue utilizada en combinación con un enriquecimiento de la población de clones de mayor producción mediante FACS y aislamiento de clones en medio semisólido. Este enriquecimiento consistió en la separación de las células en 4 subpoblaciones de acuerdo con su tamaño celular y nivel de granularidad, encontrando que la subpoblación de bajo tamaño y baja granularidad fue la que generó clones de menor producción de anticuerpos. Por lo cual la eliminación de esta subpoblación fue suficiente para enriquecer la población en clones de mayor producción. Usando esta estrategia, con alrededor de 600 clones aislados, pudimos seleccionar 7 clones con una productividad de anticuerpos igual o superior a 2 pg/célula/día. La producción del mejor clon seleccionado alcanzó niveles de producción en el rango de 100 mg/L.

Adicionalmente al trabajo de esta tesis, de dos clones productores de anticuerpo anti-TNF α bajo el control del promotor híbrido RegCG/GRE/CMV fueron utilizados para realizar estudios metabólicos, los que fueron publicados en PLoS One (Torres y cols., 2018). Donde se estudió el efecto de la hipotermia leve en dos clones que presentaron fenotipos distintos; un clon que presentó la mayor tasa inicial de proliferación (crecimiento celular máximo) y otro clon que presentó la máxima producción específica de anticuerpo. En este estudio se determinó que la baja temperatura condujo a un aumento en la viabilidad celular, y el aumento de la expresión y producción de anti-TNF α tanto en ambos clones; alcanzando los 140 mg/L a 31 °C. Adicionalmente, se observaron cambios metabólicos simultáneo desde la producción hacia el consumo de lactato y desde el consumo hacia la producción de glutamina, que se exacerbaron al reducir la temperatura del cultivo, los que coincidieron con el aumento de la producción de anticuerpo anti-TNF α .

Cabe destacar que RegCG deriva de un elemento endógeno de las células CHO, por lo cual es importante probar si el promotor RegCG y los promotores híbridos son igualmente funcional en líneas celulares derivadas de otros organismos, tales como HEK293 (humana) o NSO (murina) o son específico para células CHO. No obstante, es posible que la utilización de elementos endógenos permita generar promotores más eficientes para una línea celular determinada, en este caso células CHO, y pudiera ser una buena estrategia para mejorar líneas celulares recombinantes.

Promotor Inducible

En relación con la generación de un promotor inducible, se evaluó la capacidad de inducir aumento de actividad del promotor CMV mediante la adición de un tándem de cinco elementos de respuesta a glucocorticoide (GRE) río arriba del promotor. Preliminarmente se observó que la adición de GRE río arriba del Core de CMV (GRE/Core) permite generar un promotor inducible por la presencia de dexametasona en ensayos de expresión transiente (Figuras 17 B y C), lo que indica que el tándem de GREs es funcional y que las células CHO expresan receptores de glucocorticoides.

Al asociar GRE con CMV completo (promotor GRE/CMV) no se observó un aumento significativo de actividad en ensayos de expresión transiente. No obstante, en ensayos con clones provenientes de transfecciones estables, donde se utilizó promotores híbridos RegCG/GRE/CMV tanto para la expresión del gen reportero o de anticuerpo, se obtuvieron

resultados variables frente al estímulo con dexametasona, donde se encontraron casos de aumento significativo de la expresión, pero también se encontró casos con efecto nulo o efecto inhibitorio (Figura 17C). Este comportamiento variable pudiera tener una explicación en la presencia de sitios de reconocimiento para NFκB en el *enhancer* del promotor CMV, dado que se sabe que la vía de señalización de NFκB es una de las principales activadoras del promotor CMV (Dahodwala y cols., 2022) y que esta vía está activa en células CHO (Brown y cols., 2015). Dado que la dexametasona es un inhibidor de la vía de señalización para NFκB ((Almawi y Melemedjian, 2002), su presencia podría estar disminuyendo la actividad de promotor CMV en células CHO.

Para tratar de diferenciar entre el efecto inductor e inhibitorio de la dexametasona sobre los clones con promotores híbridos con GRE, se decidió estimular con distintas dosis de dexametasona en dos momentos de la curva de crecimiento, así se realizó un estímulo temprano y un estímulo tardío. Este experimento mostró que en la inducción temprana hay una tendencia a la inhibición de la expresión, en cambio en la inducción tardía existe una tendencia al aumento de la actividad en forma dosis dependiente. Una explicación posible para este efecto diferencial es que la vía de NFκB está más activa en los estadios temprano de los cultivos debido al estrés celular durante la fase exponencial de crecimiento, por lo cual la actividad de CMV sería altamente dependiente de NFκB. De esta forma la inhibición por dexametasona resultaría altamente significativa en la actividad final del promotor. Luego, en los estadios tardíos del cultivo es probable que la vía NFκB ya no sea tan activa debido a la disminución del estrés celular. De esta manera, el efecto inductor por dexametasona podría ser más relevante que la disminución de la vía NFκB, generando un efecto neto positivo de aumento relativo de la producción de anticuerpos.

Lo anterior también pudiera explicar la baja respuesta a la dexametasona obtenida en los ensayos de expresión transiente donde se utilizó promotor GRE/CMV, ya que estos ensayos fueron realizados en estadios tempranos de los cultivos post transfección.

Si bien los ensayos en expresión transiente muestran que las células CHO expresan receptores de glucocorticoides (GR), algunos reportes indicaban que las células CHO no expresaban niveles detectables del GR (Bellingham y Cidlowski, 1989). Es posible que la expresión de GR sea baja en estas células y probablemente la sobreexpresión de GR recombinantes pudiera hacer que estas líneas fuesen más sensibles a la presencia de dexametasona. Asimismo, la sobreexpresión del receptor estrógeno (ER) debiera hacer sensible

a estas células al estradiol y pudieran ser usadas con promotores ERE/CMV, teniendo una alternativa al uso de dexametasona.

Junto a lo anterior, la inserción del tándem de GRE entre RegCG y CMV en el promotor permitió generar un promotor que es capaz de responder al estímulo con dexametasona, sin alterar el nivel de producción de anticuerpos en cultivos sin estimular con dexametasona. Esto sugiere por un lado que es posible adicionar nuevos elementos al promotor CMV para mejorar su actividad transcripcional y que este sitio podría usarse para evaluar el efecto de otros elementos de respuesta.

Consideraciones finales; se propone que el promotor híbrido de RegCG y CMV, independientemente de la presencia de GRE, tiene mejor comportamiento en clones estables respecto a su resistencia al silenciamiento transcripcional de CMV. Esto lo hace útil para ser utilizado en la obtención de clones de alta producción de anticuerpos y otras proteínas recombinantes, permitiendo reducir el número de clones a analizar para su obtención. Esto puede tener impacto en grupos de investigación para acelerar la obtención de clones de estas características y eventualmente para la obtención para uso industrial. Además, resalta la relevancia de estudiar la actividad transcripcional de los promotores en condiciones de transfección estables que se asemejen a las condiciones productivas. Por último, los resultados concernientes al silenciamiento del promotor fueron publicados en la revista *Journal of Biological Engineering* en el año 2019 bajo el título *Development of a new promoter to avoid the silencing of genes in the production of recombinant antibodies in chinese hamster ovary cells*, copia del artículo se adjunta en el anexo de este documento.

Conclusiones

- 1) Durante el desarrollo de esta tesis, se generó un promotor de transcripción eficiente al combinar un fragmento de isla CpG del gen *ACTB* de *Cricetulus griseus* (RegCG) con el promotor CMV.
- 2) RegCG se comporta como un promotor que es capaz de sostener la expresión de proteínas recombinantes en líneas estables, el cual es más resistente al silenciamiento de genes que el promotor CMV.
- 3) La incorporación del promotor RegCG río arriba del promotor CMV permitió generar promotores híbridos que tienen mayor actividad promotora en líneas estables que los promotores parentales por separado.
- 4) La incorporación de un tándem de GREs entre las porciones RegCG y CMV del promotor híbrido RegCG/CMV generó un promotor inducible por dexametasona en clones estables células CHO-K1.
- 5) El promotor híbrido, que incorpora un tándem de GREs, es compatible con el sistema de amplificación genética en las células CHO DG44 y permiten generar líneas estables de alta producción de anticuerpos recombinantes en una proporción de 1 en 85 clones inicialmente seleccionados.
- 6) El promotor híbrido que contiene GRE puede ser utilizado para la generación de líneas celulares estables para la producción de anticuerpos recombinantes.

Referencias

- Almawi WY, and Melemedjian OK. (2002). Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol.* 28, 69-78.
- Ankenbauer, W., Strahle, U., and Schutz, G. (1988). Synergistic action of glucocorticoid and estradiol responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7526-7530.
- Antequera, F. (2003). Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci* 60, 1647-1658.
- Antoniou, M., Harland, L., Mustoe, T., Williams, S., Holdstock, J., Yague, E., Mulcahy, T., Griffiths, M., Edwards, S., Ioannou, P.A., et al. (2003). Transgenes encompassing dual-promoter CpG islands from the human TBP and HNRPA2B1 loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing. *Genomics* 82, 269-279.
- Aoyagi, S., Trotter, K.W., and Archer, T.K. (2005). ATP-dependent chromatin remodeling complexes and their role in nuclear receptor-dependent transcription in vivo. *Vitam Horm* 70, 281-307.
- Aravena, O., Pesce, B., Soto, L., Orrego, N., Sabugo, F., Wurmman, P., Molina, M.C., Alfaro, J., Cuchacovich, M., Aguilon, J.C., and Catalan, D. (2011). Anti-TNF therapy in patients with rheumatoid arthritis decreases Th1 and Th17 cell populations and expands IFN-gamma-producing NK cell and regulatory T cell subsets. *Immunobiology* 216, 1256-1263.
- Auclair, J.R. (2019). Regulatory Convergence for Biologics through Capacity Building and Training. *Trends in biotechnology* 37, 5-9.
- Avior, Y., Bomze, D., Ramon, O., and Nahmias, Y. (2013). Flavonoids as dietary regulators of nuclear receptor activity. *Food & function*, 4, 831–844.
- Bebbington, C.R., Renner, G., Thomson, S., King, D., Abrams, D., and Yarranton, G.T. (1992). High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Biotechnology (N Y)* 10, 169-175.
- Beck, A., and Reichert, J.M. (2013). Approval of the first biosimilar antibodies in Europe: a major landmark for the biopharmaceutical industry. *MAbs* 5, 621-623.
- Bellingham D.L., and Cidlowski J.A. (1989). Stable overproduction of intact glucocorticoid receptors in mammalian cells using a selectable glucocorticoid responsive dihydrofolate reductase gene. *Mol Endocrinol.* 3, 1733-1747.
- Bestor T. H. (2000). Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *J Clin Invest*, 105, 409–411.

Betts, Z., and Dickson, A.J. (2015). Assessment of UCOE on Recombinant EPO Production and Expression Stability in Amplified Chinese Hamster Ovary Cells. *Mol Biotechnol* 57, 846-858.

Bieberstein, N.I., Carrillo Oesterreich, F., Straube, K., and Neugebauer, K.M. (2012). First exon length controls active chromatin signatures and transcription. *Cell Rep* 2, 62-68.

Blackledge, N.P., Zhou, J.C., Tolstorukov, M.Y., Farcas, A.M., Park, P.J., and Klose, R.J. (2010). CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase. *Mol Cell* 38, 179-190.

Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Häsler K., Fleckenstein B., Schaffner W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*. 41, 521-530.

Boulianne, G.L., Hozumi, N., and Shulman, M.J. (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 312, 643-646.

Brendel, C., Muller-Kuller, U., Schultze-Strasser, S., Stein, S., Chen-Wichmann, L., Krattenmacher, A., Kunkel, H., Dillmann, A., Antoniou, M.N., and Grez, M. (2012). Physiological regulation of transgene expression by a lentiviral vector containing the A2UCOE linked to a myeloid promoter. *Gene Ther* 19, 1018-1029.

Brightwell, G., Poirier, V., Cole, E., Ivins, S., and Brown, K.W. (1997). Serum-dependent and cell cycle-dependent expression from a cytomegalovirus-based mammalian expression vector. *Gene* 194, 115-123.

Bromage, E., Stephens, R., and Hassoun, L. (2009). The third dimension of ELISPOTs: quantifying antibody secretion from individual plasma cells. *J Immunol Methods* 346, 75-79.

Brooks, A.R., Harkins, R.N., Wang, P., Qian, H.S., Liu, P., and Rubanyi, G.M. (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6, 395-404.

Brown, A.J., Sweeney, B., Mainwaring, D.O., and James, D.C. (2014). Synthetic promoters for CHO cell engineering. *Biotechnol Bioeng* 111, 1638-1647.

Brown, A.J., Sweeney, B., Mainwaring, D.O., and James, D.C. (2015). NF- κ B, CRE and YY1 elements are key functional regulators of CMV promoter-driven transient gene expression in CHO cells. *Biotechnol J.* 10, 1019-1028.

Carroll, S., and Al-Rubeai, M. (2004). The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting. *Expert Opin Biol Ther* 4, 1821-1829.

Carter, P. (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 1, 118-129.

Chang, M., Liu, R., Jin, Q., Liu, Y., and Wang, X. (2014). Scaffold/matrix attachment regions from CHO cell chromosome enhanced the stable transfection efficiency and the expression of transgene in CHO cells. *Biotechnol Appl Biochem* 61, 510-516.

Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., and Gilliland, G. L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel)*, 8, 55.

Choi KH, Basma H, Singh J, Cheng PW. (2005). Activation of CMV promoter-controlled glycosyltransferase and beta -galactosidase glycoconjugates by butyrate, trichostatin A, and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Glycoconj J*. 22, 63-69.

Conti F.G., Powell R., Pozzi L., Zezze G., Faraggiana T., Gannon F., and Fabbrini A. (1995). A novel line of transgenic mice (RSV/LTR-bGH) expressing growth hormone in cardiac and striated muscle. *Growth Regul*. 5, 101-108.

Dahodwala H., Amenyah S.D., Nicoletti S., Henry M.N., Lees-Murdock D.J., and Sharfstein S.T. (2022). Evaluation of site-specific methylation of the CMV promoter and its role in CHO cell productivity of a recombinant monoclonal antibody. *Antib Ther*. 5, 121-129.

Damdindorj, L., Karnan, S., Ota, A., Takahashi, M., Konishi, Y., Hossain, E., Hosokawa, Y., and Konishi, H. (2012). Assessment of the long-term transcriptional activity of a 550-bp-long human beta-actin promoter region. *Plasmid* 68, 195-200.

Danilition, S.L., Frederickson, R.M., Taylor, C.Y., and Miyamoto, N.G. (1991). Transcription factor binding and spacing constraints in the human beta-actin proximal promoter. *Nucleic Acids Res* 19, 6913-6922.

Das, A. T., Tenenbaum, L., and Berkhout, B. (2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Curr Gene Ther*. 16, 156–167.

de Taeye, S.W., Rispens, T., and Vidarsson, G. (2019). The Ligands for Human IgG and Their Effector Functions. *Antibodies (Basel)* 8.

Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25, 1010-1022.

Doevendans, E., and Schellekens, H. (2019). Immunogenicity of Innovative and Biosimilar Monoclonal Antibodies. *Antibodies (Basel)* 8.

Dou Y., Lin Y., Wang T.Y., Wang X.Y., Jia Y.L., and Zhao C.P. (2021). The CAG promoter maintains high-level transgene expression in HEK293 cells. *FEBS Open Bio*. 11, 95-104.

Du, Q., Luu, P., Stirzaker, C., and Clark, S. (2015). Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics*. 7, 1051-1073.

Eberharter, A., and Becker, P.B. (2004). ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J Cell Sci* 117, 3707-3711.

Eisenberg, E., and Levanon, E.Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet* 29, 569-574.

Escher G., Anh Hoang, A., Georges, S., Tchoua, U., El-Osta, A., Krozowski, Z., and Sviridov D. (2005). Demethylation using the epigenetic modifier, 5-azacytidine, increases the efficiency of transient transfection of macrophages. *J Lipid Res*. 46, 356-365.

Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., et al. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9, 1909-1917.

Farcas, A.M., Blackledge, N.P., Sudbery, I., Long, H.K., McGouran, J.F., Rose, N.R., Lee, S., Sims, D., Cerase, A., Sheahan, T.W., et al. (2012). KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *Elife* 1, e00205.

Farre, D., Bellora, N., Mularoni, L., Messeguer, X., and Alba, M.M. (2007). Housekeeping genes tend to show reduced upstream sequence conservation. *Genome Biol* 8, R140.

Fatemi, M., Pao, M.M., Jeong, S., Gal-Yam, E.N., Egger, G., Weisenberger, D.J., and Jones, P.A. (2005). Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Res* 33, e176.

Feng, H., Cheng, J., Luo, J., Liu, S.J., and Liu, Y. (2006). Cloning of black carp beta-actin gene and primarily detecting the function of its promoter region. *Yi Chuan Xue Bao* 33, 133-140.

Feng, J., Li, G., Liu, X., Wang, J., and Wang, Y.Q. (2014). Functional analysis of the promoter region of amphioxus beta-actin gene: a useful tool for driving gene expression in vivo. *Mol Biol Rep* 41, 6817-6826.

Ferrara, C., Brunker, P., Suter, T., Moser, S., Puntener, U., and Umana, P. (2006). Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-

acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng* 93, 851-861.

Foecking, M.K., and Hofstetter, H. (1986). Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene* 45, 101-105.

Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P., and Kouzarides, T. (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 278, 4035-4040.

Gallegos, J.E., and Rose, A.B. (2015). The enduring mystery of intron-mediated enhancement. *Plant Sci* 237, 8-15.

Gallegos, J.E., and Rose, A.B. (2017). Intron DNA Sequences Can Be More Important Than the Proximal Promoter in Determining the Site of Transcript Initiation. *Plant Cell* 29, 843-853.

Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196, 261-282.

Ginno, P.A., Lim, Y.W., Lott, P.L., Korf, I., and Chedin, F. (2013). GC skew at the 5' and 3' ends of human genes links R-loop formation to epigenetic regulation and transcription termination. *Genome Res* 23, 1590-1600.

Gottesman, M.M. (1987). Chinese hamster ovary cells. *Methods Enzymol* 151, 3-8.

Green, L.L., Hardy, M.C., Maynard-Currie, C.E., Tsuda, H., Louie, D.M., Mendez, M.J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D.H., Zeng, Y., et al. (1994). Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 7, 13-21.

Gutierrez-Gonzalez, M., Latorre, Y., Zuniga, R., Aguillon, J.C., Molina, M.C., and Altamirano, C. (2019). Transcription factor engineering in CHO cells for recombinant protein production. *Crit Rev Biotechnol* 39, 665-679.

Han, H., Cortez, C.C., Yang, X., Nichols, P.W., Jones, P.A., and Liang, G. (2011). DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum Mol Genet* 20, 4299-4310.

Hartono, S.R., Korf, I.F., and Chedin, F. (2015). GC skew is a conserved property of unmethylated CpG island promoters across vertebrates. *Nucleic Acids Res* 43, 9729-9741.

He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2509-2514.

Ho, S.C., Koh, E.Y., Soo, B.P., Mariati, Chao, S.H., and Yang, Y. (2016). Evaluating the use of a CpG free promoter for long-term recombinant protein expression stability in Chinese hamster ovary cells. *BMC Biotechnol* 16, 71.

Ho, S.C., and Yang, Y. (2014). Identifying and engineering promoters for high level and sustainable therapeutic recombinant protein production in cultured mammalian cells. *Biotechnol Lett* 36, 1569-1579.

Illingworth, R.S., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A.R., James, K.D., Turner, D.J., Smith, C., Harrison, D.J., Andrews, R., and Bird, A.P. (2010). Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* 6, e1001134.

Jazayeri, S.H., Amiri-Yekta, A., Bahrami, S., Gourabi, H., Sanati, M.H., and Khorramizadeh, M.R. (2018). Vector and Cell Line Engineering Technologies Toward Recombinant Protein Expression in Mammalian Cell Lines. *Appl Biochem Biotechnol* 185, 986-1003.

Jing Y., Qian Y., Ghandi M., He A., Borys M.C., Pan S.H., and Li Z.J. (2012). A mechanistic study on the effect of dexamethasone in moderating cell death in Chinese Hamster Ovary cell cultures. *Biotechnol Prog.* 28, 490-496.

Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19, 187-191.

Kao, F.T., and Puck, T.T. (1968). Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60, 1275-1281.

Kim, M., O'Callaghan, P.M., Droms, K.A., and James, D.C. (2011). A mechanistic understanding of production instability in CHO cell lines expressing recombinant monoclonal antibodies. *Biotechnol Bioeng* 108, 2434-2446.

Kornberg R. D. (2007). The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 12955–12961.

Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.

Kohn D.B., Kantoff P.W., Eglitis M.A., McLachlin J.R., Moen R.C., Karson E., Zwiebel J.A., Nienhuis A., Karlsson S., O'Reilly R. (1987). Retroviral-mediated gene transfer into mammalian cells. *Blood Cells.*13, 285-298.

Kong Q., Wu M., Huan Y., Zhang L., Liu H., Bou G., Luo Y., Mu Y., and Liu Z. (2009). Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs. *PLoS One*. 4, e6679.

Kong, L., Tan, L., Lv, R., Shi, Z., Xiong, L., Wu, F., Rabidou, K., Smith, M., He, C., Zhang, L., et al. (2016). A primary role of TET proteins in establishment and maintenance of De Novo bivalency at CpG islands. *Nucleic Acids Res* 44, 8682-8692.

Kosuga, M., Enosawa, S., Li, X.K., Suzuki, S., Matsuo, N., Yamada, M., Roy-Chowdhury, J., Koiwai, O., and Okuyama, T. (2000). Strong, long-term transgene expression in rat liver using chicken beta-actin promoter associated with cytomegalovirus immediate-early enhancer (CAG promoter). *Cell Transplant* 9, 675-680.

Krishnan M., Park J.M, Cao F., Wang D., Paulmurugan R., Tseng J.R., Gonzalgo M.L., Gambhir S.S., and Wu J.C. (2006). Effects of epigenetic modulation on reporter gene expression: implications for stem cell imaging. *FASEB J*. 20, 106-108.

Kunert, R., and Reinhart, D. (2016). Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 3451-3461.

Li, X., and Manley, J.L. (2006). Cotranscriptional processes and their influence on genome stability. *Genes Dev* 20, 1838-1847.

Li G., Shu Z., and Wang Y. (2013). Year-round reproduction and induced spawning of Chinese amphioxus, *Branchiostoma belcheri*, in laboratory. *PLoS One*. 8, e75461.

Lin WW, Lu YC, Chuang CH, Cheng TL. (2020). Ab locks for improving the selectivity and safety of antibody drugs. *J Biomed Sci*. 27, 76.

Liu Z. J., Moav B., Faras A.J., Guise K.S., Kapuscinski A.R., and Hackett P.B. (1990). Functional analysis of elements affecting expression of the beta-actin gene of carp. *Mol Cell Biol*. 10, 3432-3440.

Liu, J., Wei, Y., Huang, L., Wang, Y., Chen, D., Wu, H., and Liu, C. (2016). Functional characterization of a new promoter isolated from torque teno sus virus 1. *Arch Virol* 161, 303-306.

Long, H.K., Blackledge, N.P., and Klose, R.J. (2013). ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection. *Biochem Soc Trans* 41, 727-740.

Mahe, E.A., Madigou, T., and Salbert, G. (2018). Reading cytosine modifications within chromatin. *Transcription* 9, 240-247.

Mahpour A., Scruggs B.S., Smiraglia D., Ouchi T., and Gelman I.H. (2018). A methyl-sensitive element induces bidirectional transcription in TATA-less CpG island-associated promoters. *PLoS One*. 13, e0205608.

Mariati, Yeo J.H., Koh E.Y., Ho S.C., Yang Y. (2014). Insertion of core CpG island element into human CMV promoter for enhancing recombinant protein expression stability in CHO cells. *Biotechnol Prog*. 30, 523-534.

Matteson, E.L., Yocum, D.E., St Clair, E.W., Achkar, A.A., Thakor, M.S., Jacobs, M.R., Hays, A.E., Heitman, C.K., and Johnston, J.M. (1995). Treatment of active refractory rheumatoid arthritis with humanized monoclonal antibody CAMPATH-1H administered by daily subcutaneous injection. *Arthritis Rheum* 38, 1187-1193.

Miyazaki, J., Takaki, S., Araki, K., Tashiro, F., Tominaga, A., Takatsu, K., and Yamamura, K. (1989). Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene* 79, 269-277.

Moritz, B., Becker, P.B., and Gopfert, U. (2015). CMV promoter mutants with a reduced propensity to productivity loss in CHO cells. *Sci Rep* 5, 16952.

Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., and Oi, V.T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6851-6855.

Moullan, N., Mouchiroud, L., Wang, X., Ryu D., Williams, E.G., Mottis, A., Jovaisaite, V., Frochoux, M.V., Quiros, P.M., Deplancke, B., Houtkooper, R.H., and Auwerx, J. (2015). Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research. *Cell Rep*. 10, 1681–1691.

Moussa, H.F., Bsteh, D., Yelagandula, R., Pribitzer, C., Stecher, K., Bartalska, K., Michetti, L., Wang, J., Zepeda-Martinez, J.A., Elling, U., et al. (2019). Canonical PRC1 controls sequence-independent propagation of Polycomb-mediated gene silencing. *Nat Commun* 10, 1931.

Mulero-Navarro S., Carvajal-Gonzalez J.M., Herranz M., Ballestar E., Fraga M.F., Ropero S., Esteller M., Fernandez-Salguero P.M. (2006). The dioxin receptor is silenced by promoter hypermethylation in human acute lymphoblastic leukemia through inhibition of Sp1 binding. *Carcinogenesis*. 27, 1099-1104.

Muller-Kuller, U., Ackermann, M., Kolodziej, S., Brendel, C., Fritsch, J., Lachmann, N., Kunkel, H., Lausen, J., Schambach, A., Moritz, T., and Grez, M. (2015). A minimal ubiquitous chromatin opening element (UCOE) effectively prevents silencing of juxtaposed

heterologous promoters by epigenetic remodeling in multipotent and pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res* 43, 1577-1592.

Neves, L.T., Douglass, S., Spreafico, R., Venkataramanan, S., Kress, T.L., and Johnson, T.L. (2017). The histone variant H2A.Z promotes efficient cotranscriptional splicing in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* 31, 702-717.

Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.

Osterlehner, A., Simmeth, S., and Gopfert, U. (2011). Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnol Bioeng* 108, 2670-2681.

Pedrioli, A., and Oxenius, A. (2021). Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends in immunology*, 42, 1143–1158.

Presta, L.G. (2002). Engineering antibodies for therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 3, 237-256.

Prösch S., Stein J., Staak K., Liebenthal C., Volk H.D., Krüger D.H. (1996). Inactivation of the very strong HCMV immediate early promoter by DNA CpG methylation in vitro. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 377, 195-201.

Puck, T.T., Cieciura, S.J., and Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108, 945-956.

Qin, J.Y., Zhang, L., Clift, K.L., Hular, I., Xiang, A.P., Ren, B.Z., and Lahn, B.T. (2010). Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One* 5, e10611.

Rader, R.A. (2008). (Re)defining biopharmaceutical. *Nature biotechnology* 26, 743-751.

Radhakrishnan, P., Basma, H., Klinkebiel, D., Christman, J., and Cheng, P.W. (2008). Cell type-specific activation of the cytomegalovirus promoter by dimethylsulfoxide and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1944-1955.

Ramirez-Carrozzi, V.R., Braas, D., Bhatt, D.M., Cheng, C.S., Hong, C., Doty, K.R., Black, J.C., Hoffmann, A., Carey, M., and Smale, S.T. (2009). A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell* 138, 114-128.

Ratmeyer, L., Vinayak, R., Zhong, Y.Y., Zon, G., and Wilson, W.D. (1994). Sequence specific thermodynamic and structural properties for DNA:RNA duplexes. *Biochemistry* 33, 5298-5304.

Rauschert, I., Aldunate, F., Preussner, J., Arocena-Sutz, M., Peraza, V., Looso, M., Benech, J.C., and Agrelo, R. (2017). Promoter hypermethylation as a mechanism for Lamin A/C silencing in a subset of neuroblastoma cells. *PLoS One* 12, e0175953.

Ray, A., and Prefontaine, K.E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p53 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 91, 752-756.

Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C., and Kunert, R. (2015). Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 4645-4657.

Roberts, R.W., and Crothers, D.M. (1992). Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition. *Science* 258, 1463-1466.

Salmon, S.E., and Smith, B.A. (1970). Immunoglobulin synthesis and total body tumor cell number in IgG multiple myeloma. *J Clin Invest* 49, 1114-1121.

Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G., and Zhao, K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* 132, 887-898.

Schucht, R., Coroadinha, A.S., Zanta-Boussif, M.A., Verhoeyen, E., Carrondo, M.J., Hauser, H., and Wirth, D. (2006). A new generation of retroviral producer cells: predictable and stable virus production by Flp-mediated site-specific integration of retroviral vectors. *Mol Ther* 14, 285-292.

Shaul, O. (2017). How introns enhance gene expression. *Int J Biochem Cell Biol* 91, 145-155.

Shen, X., Mao, H., and Miao, S. (2011). Substitution pattern of the CAAT element in human and mouse genomes. *Genome* 54, 144-150.

Shi, Y., Xiang, J., Zhou, G., Ron, T.B., Tong, H.I., Kang, W., Sun, S., and Lu, Y. (2016). The Pacific White Shrimp beta-actin Promoter: Functional Properties and the Potential Application for Transduction System Using Recombinant Baculovirus. *Mar Biotechnol (NY)* 18, 349-358.

Spenger, A., Ernst, W., Condreay, J.P., Kost, T.A., and Grabherr, R. (2004). Influence of promoter choice and trichostatin A treatment on expression of baculovirus delivered genes in mammalian cells. *Protein Expr Purif* 38, 17-23.

Stenberg, R.M., Thomsen, D.R., and Stinski M.F. (1984). Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *J Virol.* 49, 190-199.

Stinski, M.F. (1992). Transfer vectors and microorganisms containing human cytomegalovirus immediate-early promoter-regulatory DNA sequence. (US Patent No. 5168062).

Stinski, M.F., and Isomura, H. (2008). Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency. *Med Microbiol Immunol* 197, 223-231.

Strahle, U., Munsterberg, A., Mestrlil, R., Klock, G., Ankenbauer, W., Schmid, W., and Schutz, G. (1988a). Cooperative action of the glucocorticoid receptor and transcription factors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53 Pt 2, 835-841.

Strahle, U., Schmid, W., and Schutz, G. (1988b). Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. *EMBO J* 7, 3389-3395.

Swindle C.S., and Klug C.A. (2002). Mechanisms that regulate silencing of gene expression from retroviral vectors. *J Hematother Stem Cell Res.* 11, 449-456.

Tejwani, V., Andersen, M.R., Nam, J.H., and Sharfstein, S.T. (2018). Glycoengineering in CHO Cells: Advances in Systems Biology. *Biotechnol J* 13, e1700234.

Thomas, P.B., Risinger, K.E., and Klinge, C.M. (2003). Identification of estrogen receptor beta expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells and comparison of estrogen-responsive gene transcription in cells adapted to serum-free media. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86, 41-55.

Thomsen, D.R., Stenberg, R.M., Goins, W.F., and Stinski, M.F. (1984). Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 659-663.

Tiller, K.E., and Tessier, P.M. (2015). Advances in Antibody Design. *Annu Rev Biomed Eng* 17, 191-216.

Torres, M., Zuniga, R., Gutierrez, M., Vergara, M., Collazo, N., Reyes, J., Berrios, J., Aguillon, J.C., Molina, M.C., and Altamirano, C. (2018). Mild hypothermia upregulates myc and xbp1s expression and improves anti-TNFalpha production in CHO cells. *PLoS One* 13, e0194510.

Trotter, K.W., and Archer, T.K. (2007). Nuclear receptors and chromatin remodeling machinery. *Mol Cell Endocrinol* 265-266, 162-167.

Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A.M., and Chasin, L.A. (1983). Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell* 33, 405-412.

Urquhart, L. (2018). Market watch: Top drugs and companies by sales in 2017. *Nat Rev Drug Discov* 17, 232.

Van Kroonenburgh, M.J., and Pauwels, E.K. (1988). Human immunological response to mouse monoclonal antibodies in the treatment or diagnosis of malignant diseases. *Nucl Med Commun* 9, 919-930.

Vaughan, T.J., Osbourn, J.K., and Tempest, P.R. (1998). Human antibodies by design. *Nat Biotechnol* 16, 535-539.

Walsh, G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol* 32, 992-1000.

Werner, R.G., Noe, W., Kopp, K., and Schluter, M. (1998). Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals. *Arzneimittelforschung* 48, 870-880.

Williams, S., Mustoe, T., Mulcahy, T., Griffiths, M., Simpson, D., Antoniou, M., Irvine, A., Mountain, A., and Crombie, R. (2005). CpG-island fragments from the HNRPA2B1/CBX3 genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells. *BMC Biotechnol* 5, 17.

Wurm, F.M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22, 1393-1398.

Xiao, X., Li, M., Wang, K., Qin, Q., and Chen, X. (2011). Characterization of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) beta-actin promoter supports beta-actin gene as an internal control for gene expression modulation and its potential application in transgenic studies in fish. *Fish Shellfish Immunol* 30, 1072-1079.

Yang, Y., Mariati, Chusainow, J., and Yap M.G. (2010). DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines. *J Biotechnol* 147, 180-185.

Zhu, P., Aller, M.I., Baron, U., Cambridge, S., Bausen, M., Herb, J., Sawinski, J., Cetin, A., Osten, P., Nelson, M.L., Kügler, S., Seeburg, P.H., Sprengel, R. and Hasan, M.T. (2007). Silencing and un-silencing of tetracycline-controlled genes in neurons. *PLoS uno.* 2, e533.

Zuniga, R.A., Gutierrez-Gonzalez, M., Collazo, N., Sotelo, P.H., Ribeiro, C.H., Altamirano, C., Lorenzo, C., Aguillon, J.C., and Molina, M.C. (2019). Development of a new

promoter to avoid the silencing of genes in the production of recombinant antibodies in chinese hamster ovary cells. J Biol Eng 13, 59.

Anexo

Copia artículo de revista científica:

Zuniga, R.A., Gutierrez-Gonzalez, M., Collazo, N., Sotelo, P.H., Ribeiro, C.H., Altamirano, C., Lorenzo, C., Aguillon, J.C., and Molina, M.C. (2019). Development of a new promoter to avoid the silencing of genes in the production of recombinant antibodies in chinese hamster ovary cells. *J Biol Eng* 13, 59.



Development of a new promoter to avoid the silencing of genes in the production of recombinant antibodies in chinese hamster ovary cells

Roberto A Zúñiga^{1,2}, Matías Gutiérrez-González^{1,7}, Norberto Collazo⁶, Pablo Hérnan Sotelo³, Carolina H Ribeiro¹, Claudia Altamirano⁵, Carmen Lorenzo⁴, Juan Carlos Aguillón^{1*} and María Carmen Molina^{1*}

Abstract

Background: The production of recombinant proteins in mammalian cell lines is one of the most important areas in biopharmaceutical industry. Viral transcriptional promoters are widely used to express recombinant proteins in mammalian cell lines. However, these promoters are susceptible to silencing, thus limiting protein productivity. Some CpG islands can avoid the silencing of housekeeping genes; for that reason, they have been used to increase the production of recombinant genes in cells of animal origin. In this study, we evaluated the CpG island of the promoter region of the β -actin gene of *Cricetulus griseus* (Chinese hamster), associated to the Cytomegalovirus (CMV) promoter, to increase recombinant antibodies production in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells.

Results: We focused on the non-coding region of CpG island, which we called RegCG. RegCG behaved as a promoter, whose transcriptional activity was mainly commanded by the CAAT and CArG boxes of the proximal promoter. However, the transcription started mainly at the intronic region before the proximal transcription start site. While the CMV promoter was initially more powerful than RegCG, the latter promoter was more resistant to silencing than the CMV promoter in stable cell lines, and its activity was improved when combined with the CMV promoter. Thereby, the chimeric promoter was able to maintain the expression of recombinant antibodies in stable clones for 40 days at an average level 4 times higher than the CMV promoter. Finally, the chimeric promoter showed compatibility with a genetic amplification system by induction with methotrexate in cells deficient in the *dihydrofolate reductase* gene.

Conclusions: We have generated an efficient synthetic hybrid transcription promoter through the combination of RegCG with CMV, which, in stable cell lines, shows greater activity than when both promoters are used separately. Our chimeric promoter is compatible with a genetic amplification system in CHO DG44 cells and makes possible the generation of stable cell lines with high production of recombinant antibodies. We propose that this promoter can be a good alternative for the generation of clones expressing high amount of recombinant proteins, essential for industrial applications.

Keywords: Recombinant antibody production, Promoter, Gene expression, Chinese hamster ovary (CHO) cells

* Correspondence: jaguillo@med.uchile.cl; mcmolina@med.uchile.cl

¹Centro de Inmunobiología, Programa de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Full list of author information is available at the end of the article



Background

The production of recombinant proteins is one of the most important areas in biopharmaceutical industry. Among these proteins, recombinant monoclonal antibodies are of great interest because of their diversity and high specificity [1]; moreover, their therapeutic use has provided a great impact on the treatment of several diseases [2–4].

Chinese Hamster Ovary (CHO) cells have been used as the main platform for the industrial production of antibodies and other complex biopharmaceuticals, as they generate recombinant proteins with correct assembly and glycosylation patterns compatible with their clinical use. Viral transcriptional promoters, such as Cytomegalovirus (CMV) and simian virus 40 (SV40), among others, are strong promoters that are widely used to express recombinant proteins in mammalian cell lines [5]. However, these promoters are susceptible to silencing [6], which is characterized by methylation of transfected DNA in cytosine residues, resulting in the decrease of recombinant protein production [7, 8]. Therefore, obtaining stable cell lines with high levels of gene expression by using standard transfection techniques is a fortuitous event of low frequency. In this sense, ensuring the production of an industrial quality clone requires the isolation and analysis of a large number of clones, which increases development costs.

The CpG islands, which correspond to regions of DNA rich in CpG dinucleotides, provide the maintenance of extensively demethylated regions of the genome. The demethylated state of these islands allows the nucleosome to acquire a less compact configuration, which makes it more accessible to the transcriptional machinery [9–12]. More than 80% of housekeeping (HK) gene promoters are associated with CpG islands [13]. Of note, as HK genes are involved in the basic maintenance of cells, they remain at constant expression levels in all cells [14]. The β -actin (*ACTB*) gene is a well-studied HK gene. It has a promoter with a CpG island that extends the proximal transcription start site (TSS), the intron I, and part of the exon II [15]. Such characteristics have led to the use of *ACTB* gene promoters from human [16], chicken [17], shrimp [18], fish [19, 20], and amphioxus [21] origin for the expression of recombinant genes.

The general aim of this work was to evaluate the use of the CpG island of the *ACTB* gene promoter of *Crickettulus griseus* (Chinese hamster) to increase the expression of recombinant antibodies in CHO cells. We studied the promoter characteristics of the *ACTB* gene upon incorporation of a CpG island (RegCG). In addition, we generated chimeric promoters that combined RegCG with the CMV promoter and other regulation elements, such as glucocorticoid response elements

(GRE) and their promoter activities were compared with those of CMV promoter alone. Finally, we tested the ability of one chimeric promoter to produce antibodies in CHO cell lines.

Materials and methods

DNA isolation and PCR

The plasmids were purified from transformed *E. coli* DH5 α cells using the Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit (Promega, USA), and then cut with restriction enzymes from Invitrogen (USA) or New England Biolabs (USA). The DNA fragments were purified with the Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega, USA) from agarose gels between 1 to 1.2% (w/v) in TBE buffer. Genomic DNA obtained from CHO-K1 (ATCC[®] CCL-61[™]) cells was purified using the PureLink[™] Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA). The PCR reactions for DNA fragments analysis were carried out with the GoTaq[®] Green Master Mix Kit (Promega, USA). The PCR reactions to generate cloning fragments were performed with KAPA HiFi HotStart high-fidelity DNA polymerase (Kapa Biosystems, USA).

Cell culture and media

CHO-K1 cells were cultured in adherent conditions in the chemically defined medium DMEM/F12 (Gibco, USA), supplemented with 5% (v/v) of fetal bovine serum (FBS) (HyClone, USA) and 100 mM of L-glutamine (Gibco, USA). Suspension-adapted, dihydrofolate reductase (DHFR)-deficient CHO DG44 cells were obtained from ThermoFisher Scientific (USA) and initially cultured in a chemically defined CD-DG44 medium (Gibco, USA) with a mixture of sodium hypoxanthine and thymidine (HT).

Plasmid design and construction

The RegCG fragment was obtained from CHO-K1 cell genomic DNA by PCR using the PactFw and PactRv primers (Additional file 1: Table S1). The CMV promoter and CMV enhancer were obtained by PCR from the pcDNA3.1 (-) vector (Invitrogen, USA) using the CMVcFor01 and CMVrev01 primers to CMV promoter, and CMVcFor01 and ENHVrev01 primers to CMV enhancer (Additional file 1: Table S1). The ENHVrev01 primer anneals immediately upstream the Core region. The ends of the oligonucleotides used for amplifications contained the restriction sites required for insertion in the corresponding vectors (Additional file 1: Table S1). To generate Core and GRE fragment pairs of oligonucleotides of complementary sequences, an amount of 38 to 60 nucleotides (Additional file 1: Table S1 and Additional file 2: Figure S1) that covered the sequences of Core and GRE were synthesized. Each pair of oligonucleotides were hybridized leaving five nucleotides out of

phase to generate cohesive ends. Transcription reporter vectors were constructed by inserting the promoter sequences into the polylinker site of pGL4.17 vector (Promega, USA) (Fig. 1c). The bicistronic vectors for the expression of an anti-human CD20 antibody were constructed by modifying a specific reporter vector where the luciferase gene was replaced by an insert containing the genes of the light and heavy chains of the antibody

separated by an internal ribosome entry site (IRES) sequence (Fig. 4a). In order to express heavy and light chain genes of an anti-human tumor necrosis factor (TNF) antibody, two vectors were constructed. Briefly, the vector for the heavy chain (TNF-H) expression was constructed based on the reporter vector pGL-RegCG/GRE/CMV, in which the Luc gene was replaced by the heavy chain coding gene of the anti-TNF antibody

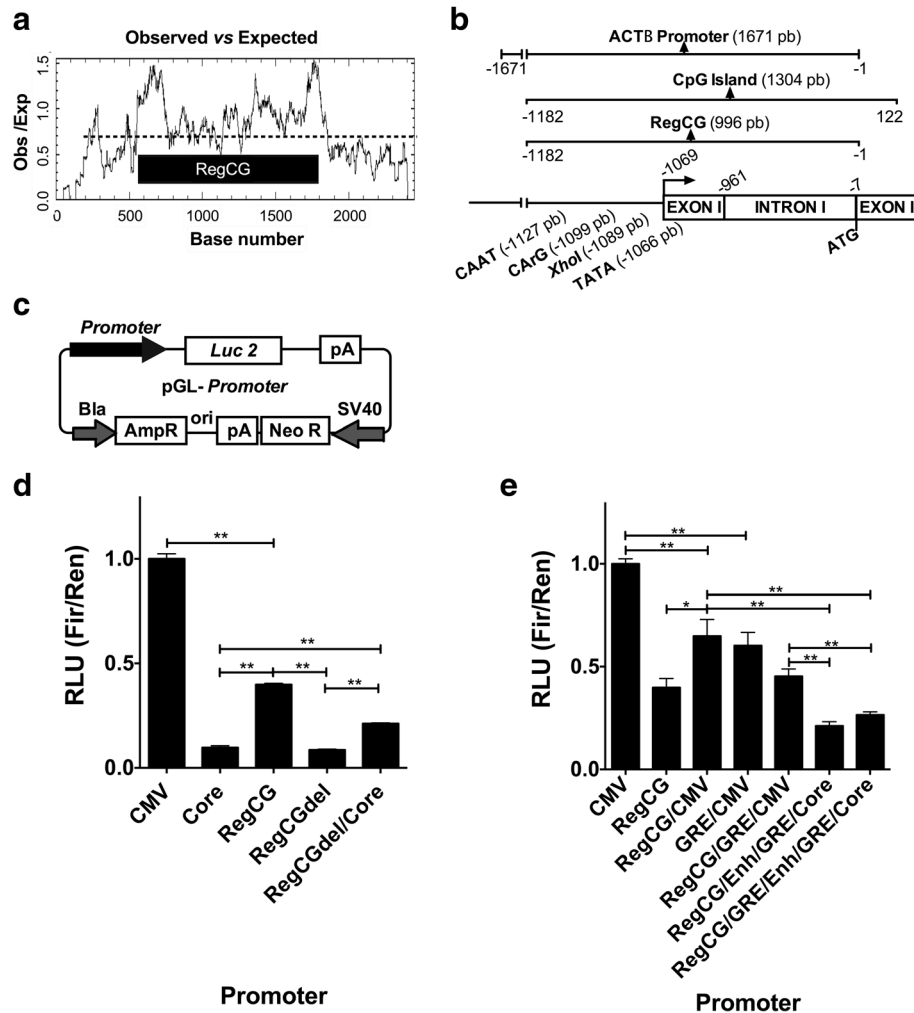


Fig. 1 RegCG shows transcriptional activity, which can be improved by the cytomegalovirus (CMV) promoter. **a** Plot of observed versus expected CpG values (Obs / Exp), calculated by the Gardiner-Garden and Frommer method [15], using the CpGplot tool from the European Bioinformatics Institute (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpGplot/). The RegCG region is indicated in the inside box. **b** Schematic representation of the *ACTB* gene region that contains a CpG island where the promoter, the CpG island, and the region—named RegCG—are indicated. In addition, the CAAT (-1127 pb), CArG (-1099 pb) and TATA (-1066 pb) boxes, the XhoI (-1089 pb) restriction site, the hypothetical proximal TSS, the exon I, the intron I, part of the exon II, and the start codon of the β -actin coding sequence (ATG) are designated. **c** Schematic representation pGL-promoter reporter vectors derived from pGL4.17 vector containing recombinant promoters. **d**, and **e** Transient reporter transcriptional activity of CHO-K1 cells co-transfected with the pGL-promoter vectors which express the firefly luciferase gene, and the normalization pGL4.73 vector, which expresses the renilla luciferase gene. Each promoter is indicated on the x-axis of the graph. Each point represents the activity value, expressed as relative light units (RLU), normalized against renilla activity (Fir/Ren). The RLU measurements were normalized with respect to the average activity of the CMV promoter, which was assigned to a RLU value equal to 1.0. Graphs **d** are representative of two experiments with six points per measurement in each one. Graph **e** represents the integration of two experiments with three points per measurement in each one normalized through CMV average activity ($n = 6$). Data are presented as mean values \pm standard deviation (S.D.). The one-tailed unpaired t-test, Mann-Whitney test, was used for statistical analysis. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$

(pRegCG/GRE/CMV-TNF-H). The vector for the light chain (TNF-L) expression was constructed by replacing the CMV promoter of the pOptiVEC™-TOPO® vector (Invitrogen, USA), between the restriction sites Sal I and BamHI, by a fragment containing the RegCG/GRE/CMC vector, followed by the light coding chain gene of the anti-TNF antibody. This fragment was inserted upstream IRES, allowing the co-expression of the anti-TNF-L and *dhfr* genes under the control of the same promoter (pRegCG/GRE/CMV-TNF-L) (Fig. 5a).

Transfection of adherent CHO-K1 cells

For transient assays to generate stable cells lines, the following transfection protocol was carried out: the parental CHO-K1 cells were incubated at 300,000 cells/mL in 500 µL of DMEM-F12 medium (Gibco, USA) supplemented with 10% FBS and 100 mM L-glutamine at 37 °C and 5% (v/v) CO₂. When reaching 80 to 90% of confluence, the cells were transfected; for this purpose, the culture medium was removed and a mixture containing 500 ng of expression vector was added with 20 µL of Lipofectamine 2000 CD (Invitrogen, USA) in 100 µL of OptiMEM medium (Invitrogen, USA), and cells were incubated for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. Next, the transfection mixture was removed, cells were fed with 500 µL of DMEM-F12 medium supplemented with 10% FBS and then cells were incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO₂.

Transcriptional reporter assays

To measure the transient activity of promoters, CHO-K1 cells were co-transfected with the transcription reporter vector derived from the pGL4.17 vector (Promega, USA), and the normalizing pGL4.73 vector (Promega, USA), following the protocol described above. The transfected cells were collected and lysed after 48 h of culture, according to the instructions of the “Dual-Glo® Luciferase Assay System” (Promega, USA), and luminescence was measured in a Luminoskan ASCENT luminometer (Thermo Electronic Corporation). The promoter activity was calculated by the quotient between the luciferase activities of firefly and renilla (FIR/REN) and expressed as relative light units (RLU).

To measure the activity of promoters in stable cell lines, CHO-K1 cells were transfected with pre-linearized expression reporter vectors followed by clone isolation through limiting dilution in the presence of the selection antibiotic G418 (Gibco, USA); dilutions were performed in 96-well culture plates with DMEM-F12 medium supplemented with 10% FBS, and 100 mM L-glutamine at 37 °C and 5% CO₂, in the presence of the selection antibiotic G418. Reporter activity from the cell lysate was determined using the Bright-Glo™ luciferase assay system (Promega, USA), and normalized by the total protein concentration determined by the Bradford assay.

Reporter activity was expressed as RLU, equivalent to the quotient between the luciferase activity of firefly and the total protein concentration (FIR/Prot).

Generation of anti-human CD20 antibody-producing cell lines

CHO-K1 cells were transfected with a pre-linearized bicistronic expression vector (pRegCG/GRE/CMV-aCD20LH) coding for the heavy and light chains of the anti-human CD20 antibody in one vector, according to the protocol described above.

Generation of anti-human TNF antibody-producing cell lines

The parental CHO DG44 cells were co-transfected with the linearized plasmids pRegCG/GRE/CMV-aTNF-H and pRegCG/GRE/CMV-aTNF-L, which code for the heavy and light chains of the chimeric anti-human TNF antibody, respectively, as described in Torres et al., 2018 [22]. The cells were transfected using the FreeStyle™ MAX System Reagent (Invitrogen, USA), following the manufacturer's instructions. To obtain clones of higher production, the transfected cells were subjected to gene amplification by the methotrexate (MTX)-based method and enriched by flow cytometry at 4 °C, as described in Torres et al. (2018) [22]. Finally, clonally-derived cell lines were isolated in semi-solid ClonaCell™ medium (STEMCELL Technologies Inc., Canada) [22] and cultured for 15 days; visible colonies were then isolated manually by aspiration with a micropipette. Approximately 600 clones were isolated and grown in 96-well culture plates in suspension. The clones were evaluated in terms of production of the anti-TNF antibody by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described below. In each step of scaling, the 10 clones of higher production were selected for their relative level of antibody production. Next, cell lines were scaled sequentially until reaching cultures in Erlenmeyers of 125 mL. Finally, antibody-producing cultures were established by growing the cells at 37 °C in a chemically defined BalanCD®CHO Growth A medium (Irvine Scientific, USA) supplemented with 4 mM L-Glutamine. Cells were cultured in duplicate in 125 mL Spinner flasks (Techné™, UK) with a working volume of 60 mL, seeded at 0.8×10^6 cells/mL, and $\geq 95\%$ viability. All cell cultures were incubated in a Mco-17Aic CO₂ Incubator (SANYO Electric Co., Ltd., Japan) at a 5% CO₂ enriched atmosphere.

Determination of antibody production

The production levels of anti-human CD20 and anti-human TNF antibodies in CHO-K1 and CHO DG44 cells were determined by measuring the concentration of the antibodies in the culture supernatants, which was

quantified by an antigen capture ELISA prepared in our laboratory, and described in [22].

Gene expression analysis by RT-PCR

RNA was extracted from cells using E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit I (Omega Bio-tek Inc., USA), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was quantified using a Synergy 2 Spectrophotometer (BIO-TEK Instruments, Inc., USA). RNA extracts (2 µg) were treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA) to remove any trace of genomic DNA contamination. Reverse transcriptase production of cDNA from the RNA was performed using an Affinity Script enzyme (Agilent Genomics, USA) and oligo dT. The amplification of the specific cDNA was carried out by PCR with the GoTaq[®] Green Master Mix Kit (Promega, USA), and the amplification products were analyzed by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gels.

Results

In order to identify the CpG island associated with the *ACTB* gene of *Cricetulus griceus*, we analyzed the *ACTB* gene promoter sequence obtained from a contig of the genome of *Cricetulus griceus* using nBLAST of National Center for Biotechnology Information (NCBI). The sequence of this contig was compared with its orthologous human, mouse, and rat genomic DNA sequences, using Clustal Omega (European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI), to identify the promoter and coding regions (Fig. 1a). The sequence was numbered using as reference (+ 1) to the first base of the start codon of the *ACTB* gene. We identified phylogenetically conserved elements of *ACTB* gene promoters in eukaryotes [23, 24], such as CAAT (-1126 to -1123), CARg (-1098 to -1089) and TATA boxes (-1066 to -1063), and a proximal TSS (-1069), which starts the exon I, followed by the intron I in the non-coding region (-1070 to -7), along with the exon II, which starts at -6 (Fig. 1b). In this contig, using the EMBOSS Cpgplot tools (European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI), we identified a CpG island with a 67.7% CG content of 1304 bp that starts at position -1182 of the 5'UTR region of the *ACTB* gene promoter (Fig. 1a). This CpG island did not include the 5' region of the promoter; however, it included the proximal promoter elements (CAAT, CARg and TATA boxes), exon I, and intron I, and ended at the position + 122, falling in exon II. Therefore, it also included a small portion of the coding region of the *ACTB* gene (Fig. 1b).

The CpG island of the *ACTB* gene has transcriptional activity, which is enhanced by the CMV promoter

Since the CpG island included the characteristic elements of the *ACTB* gene promoter, we decided to test whether this promoter had transcriptional activity. For

that purpose, we cloned the non-coding CpG island region (RegCG) into the transcription reporter vector pGL4.17 (Fig. 1c). To avoid translation from the start codon of the *ACTB* gene above the start codon of the recombinant gene, the 122 bp of the coding region of the *ACTB* gene was not included. The activity of this region was compared with the activity of the CMV promoter and a short CMV promoter containing only the CAAT and TATA boxes motifs (Core) through transient expression assays performed on the CHO-K1 cell line after 48 h of culture. We observed that the RegCG promoter possessed approximately 40% activity from the CMV promoter and that its activity was 4-fold greater than that of the CMV Core promoter (Fig. 1d). Therefore, these results indicated that RegCG could act as a promoter.

Since RegCG does not contain the 5' region of the *ACTB* gene promoter, the role of the CARg and CAAT elements in the transcriptional activity of RegCG was analyzed. For this purpose, we built a CpG mutant that did not contain the CAAT and CARg boxes, and the sequence located upstream the *XhoI* restriction site was eliminated (RegCGdel). This mutant showed a 5-fold decrease in activity compared to the RegCG promoter (Fig. 1d), suggesting that CAAT and CARg elements are critical for the promoter activity. However, the inactivation of the mutant was not absolute, since it showed some transcriptional activity. The activity of this mutant was comparable to that of the CMV Core promoter, and it was capable of increasing the activity of the CMV Core promoter (RegCGdel/Core) (Fig. 1d). The activity of the mutant promoter may have been mediated by the TATA box motif.

In order to increase RegCG promoter activity, we generated the chimeric RegCG/CMV promoter by inserting RegCG upstream the CMV promoter, followed by its cloning into the pGL4.17 vector. The analysis of the activity of the RegCG/CMV promoter, measured in transient transfection assays, showed that this association allowed the chimeric promoter to achieve reporter activity levels 25% higher than the RegCG promoter, which suggests that CMV adds its activity to RegCG (Fig. 1e). On the other hand, the chimeric promoter presented less activity than the CMV promoter, reaching only 64.9% activity (Fig. 1e), suggesting that RegCG interferes with the CMV promoter activity.

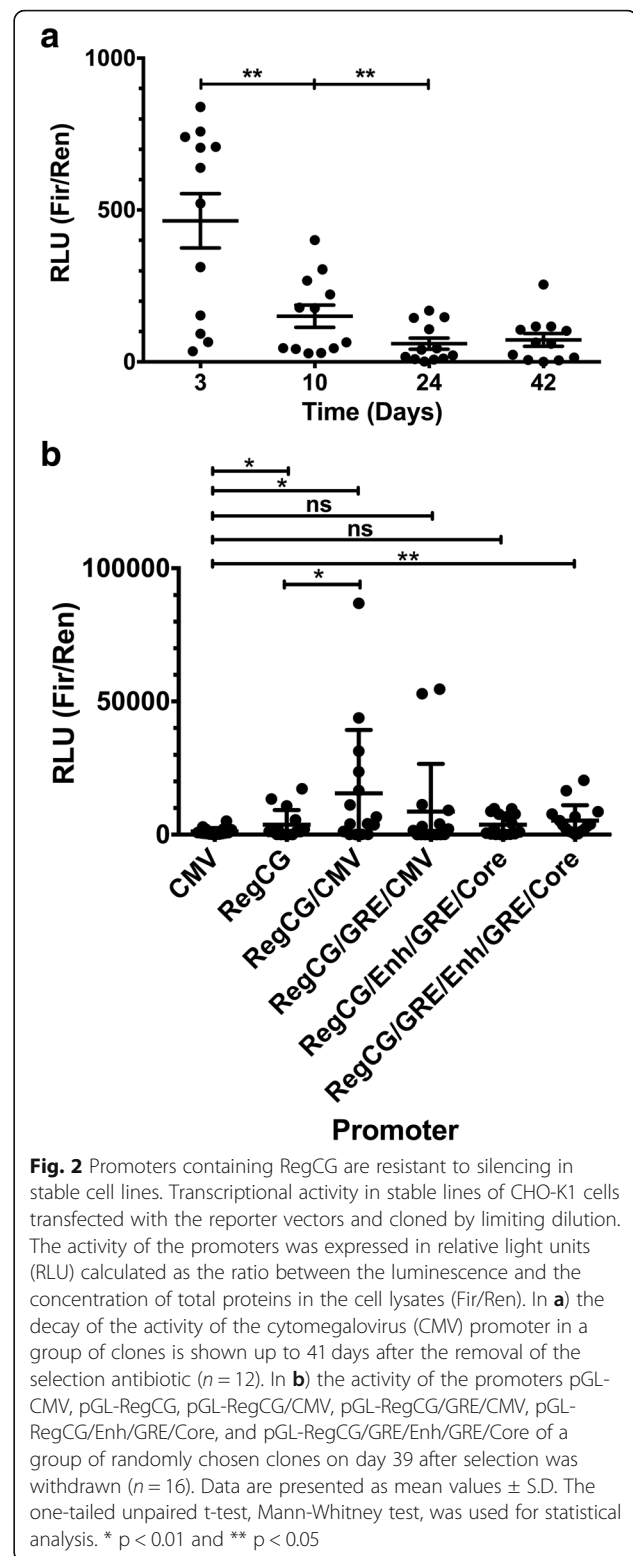
Additionally, we incorporated a tandem of five GRE upstream the CMV promoter, which was useful to test the effect of the presence of additional elements in the chimeric promoter activity. This element was inserted upstream the CMV promoter, generating the GRE/CMV and RegCG/GRE/CMV promoters, and inside the CMV promoter, between the enhancer and the Core regions, generating the RegCG/Enh/GRE/Core and RegCG/GRE/

Enh/GRE/Core promoters. The transcriptional activity in transient expression assays showed that the GRE element located upstream the CMV promoter caused a decreased activity with respect to the activity of the CMV promoter (Fig. 1e), as observed by the addition of RegCG. Moreover, introduction of GRE inside the CMV promoter generated a more drastic decrease in the transcriptional activity. Therefore, the incorporation of additional elements in the chimeric promoter decreases its activity, which may reach even less activity when compared to that of the RegCG promoter alone. Thus, in transient assays, the CMV promoter is the best promoter among the variants tested.

Promoters that contain RegCG are more resistant to silencing

Promoter silencing leads to a decrease in their transcriptional activity. To test the effect of RegCG on the silencing of the CMV promoter, the activity of RegCG/CMV, RegCG/GRE/CMV, RegCG/Enh/GRE/Core, and RegCG/GRE/Enh/GRE/Core promoters was evaluated by a reporter system of the transcription in stable cell lines, and compared with the activity of CMV and RegCG promoters alone. Stable CHO-K1 cell lines were generated and cultured in the presence of the selection antibiotic until the culture was established. After that, the selector was removed to freely allow the silencing of the recombinant gene. Analysis of the activity decay of the CMV promoter revealed that, at 40 days of culture, and after the withdrawal of the selection antibiotic, there was a stabilized level of promoter activity, reaching about 10% of the initial values (Fig. 2a). To determine whether the different promoters presented better resistance to silencing than the CMV promoter, 16 clones of each transfection were selected at random and sub-cultured until day 39 after removal of the selection antibiotic. At this time point, the reporter activity of each clone was analyzed and compared with clones bearing the CMV promoter (Fig. 2b). The results showed that the clones carrying the RegCG promoter had a 3-fold increase in average activity compared with clones carrying the CMV promoter, indicating that RegCG induces resistance to gene silencing. As expected, clones with RegCG/CMV exceeded 5-fold the average activity of clones carrying the RegCG promoter, suggesting that there is an additive effect between RegCG and the CMV promoter. The second most active promoter was RegCG/GRE/CMV, whose clones reached a 2-fold increase in the activity compared to RegCG clones.

To test the role of RegCG in the RegCG/CMV and RegCG/GRE/CMV promoters in stabilized cell lines, we used chimeric promoters with disrupted CMV promoter by the insertion of a GRE element between its enhancer and Core regions (RegCG/Enh/GRE/Core and RegCG/



GRE/Enh/GRE/Core). Although promoters with the disrupted CMV promoter had less transcriptional activity than RegCG in transient assays (Fig. 1d), surprisingly, in stable clones, these promoters showed similar activities

with respect to RegCG (Fig. 2b). Therefore, RegCG maintains the transcriptional activity of the chimeric promoters when the activity of the CMV promoter is decreased. On the other hand, these data also showed that the presence of the CMV promoter is important for the increased activity of the chimeric promoter. Altogether, these results suggest that RegCG and CMV promoters may function in tandem, resulting in an additive effect that is reflected in increased recombinant protein production. However, given that in the individual analysis of the RegCG and CMV promoters it was observed that RegCG maintains higher levels of transcription in stabilized clones than the CMV promoter, we conclude that RegCG has an active role in decreasing the silencing of the chimeric promoters.

The transcriptional activity of RegCG starts in an intronic TSS

In order to determine whether the RegCG region of the RegCG/GRE/CMV promoter was transcriptionally active, CHO DG44 cell line, transfected with vectors that code for an anti-human TNF antibody (Fig. 5a), were harvested in the exponential phase of a suspension culture and specific RT-PCR assays were performed. Several forward (F) primers were designed to recognize the RegCG region of the chimeric promoter: primers F1 and F2 for exon I; primer F3 for the intersection exon/intron; and primers F4, F5 and F6 for intron I (Fig. 3a). To avoid the amplification of the endogenous promoter of the β -actin gene, we used a reverse (R) primer to anneal the enhancer of the CMV promoter (primer R1). The absence of genomic DNA was confirmed by the size of the amplification product with primers F8 and R3 (Fig. 3b, line F8/R3), which flank an intron of the *ACTB* gene with an expected amplification size of 711 bp from genomic DNA and 256 bp from mRNA. The intensity of amplification from recombinant mRNA was comparable to amplification from plasmid DNA vector (Fig. 3b, lines F7/R2).

In these tests, amplification was observed with F1, F2, F4 and F6 primers in the sample with mRNA (Fig. 3c), showing that the RegCG portion of the chimeric promoter presents transcriptional activity. In addition, we observed that the size of the amplification products obtained with F1 and F2 primers annealed upstream the intron I, and that F4 and F6 primers annealed within the intron I, and are of the same size as those obtained with their vector DNA controls (Fig. 3c, lanes F1/R1, F2/R1, F4/R1 and F6/R1), which showed that the transcript produced is not processed. When the intensities of the amplifications were compared with the mRNA sample with respect to its vector DNA control, it was observed that amplification with the F6 primer was greater than that obtained with the primers that annealed upstream

(Fig. 3c, lanes F6/R1). This difference in intensity suggests that there is a possible start site for additional transcription within the intron that would be located between the annealing sites of F5 and F6 primers.

Using the same cDNA preparation, we tested the functionality of primary TSS of the endogenous *ACTB* gene, as well as some of the forward primers used in the analysis of transcription from the chimeric promoter. In order to achieve a specific amplification, we used a reverse primer that recognizes the coding region of the *ACTB* gene. In this assay, using the F2 primer, we found a potent amplification downstream the theoretical proximal TSS of the *ACTB* gene (Fig. 3d, F2/R3), which corresponds to the expected amplification product after splicing of the messenger of 744 pb (Fig. 3d, F8/R3). The amplification products obtained with F3, F5 and F6 primers showed amplification sizes that did not coincide with those expected for unprocessed RNA (Fig. 3d, F6/R3). These results indicate that RegCG has a different behavior than the *ACTB* promoter, where, in the RegCG region of the chimeric promoter, the main responsible for the transcriptional activity is the intronic TSS, unlike the endogenous promoter, where the main responsible for the transcriptional activity is the proximal TSS.

Promoters containing RegCG increase the production of a recombinant antibody

The effect of RegCG-containing promoters in the production of recombinant antibodies was tested by the expression of an anti-human CD20 chimeric antibody in CHO cells using a bicistronic expression system. The RegCG/CMV and RegCG/GRE/CMV promoters were selected because they showed the highest transcriptional activity with the reporter system in stable clones (Fig. 2b). The bicistronic vectors were constructed by replacing the luciferase gene in the reporter vectors containing the respective promoters with the heavy and light chain genes of the anti-CD20 antibody (anti-CD20-H and anti-CD20-L, respectively) separated by an IRES (Fig. 4a). Stable recombinant CHO-K1 cell lines were generated by transfection with expression vectors RegCG/CMV-aCD20, RegCG/GRE/CMV-aCD20 and CMV-aCD20, which contained RegCG/CMV and RegCG/GRE/CMV chimeric promoters, and the CMV promoter, respectively. Fifty-six clones of each construct were collected randomly and cultured in the absence of selection antibiotics for a period of approximately 40 days to allow promoter silencing. This period of silencing was previously determined for clones generated with the CMV promoter (Fig. 2a). As shown on Fig. 4b, 30, out of 56 CMV clones produced a measurable antibody concentration, whereas for RegCG/CMV and RegCG/GRE/CMV clones, 39 and 40 clones, respectively, produced a measurable antibody concentration.

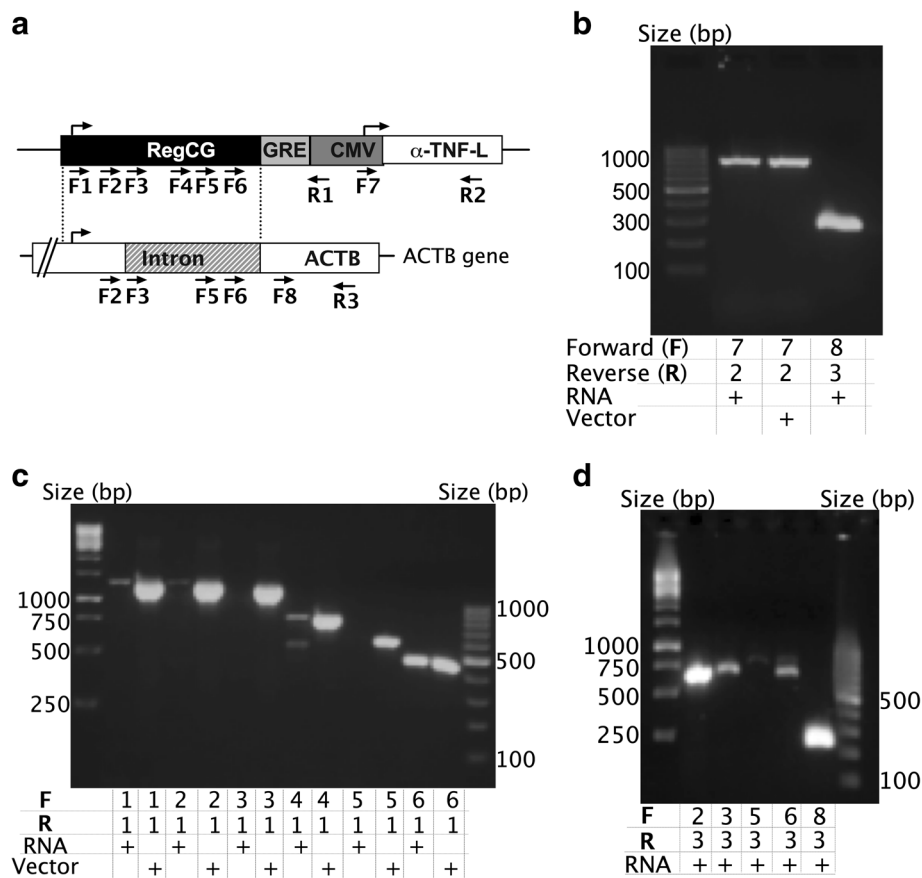
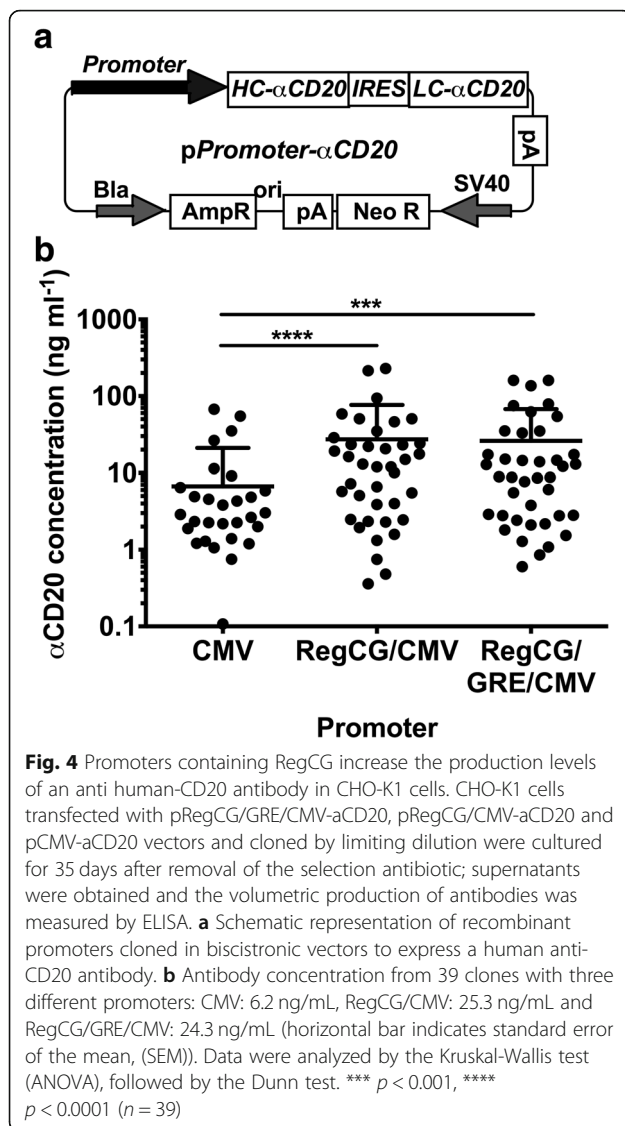


Fig. 3 Promoter RegCG has a transcription start site in the intron I. The transcription start site (TSS) from RegCG in the chimeric promoter RegCG/GRE/CMV was analyzed in cells derived from CHO DG44 cells co-transfected with pRegCG/GRE/CMV- α TNF-L and pRegCG/GRE/CMV- α TNF-H vectors. Total RNA was isolated from a culture of cells in the exponential phase, and cDNA was prepared. Primers that anneal to different parts of RegCG and cytomegalovirus (CMV) were used. **a**) Schematic representation of the recombinant anti-TNF-L gene commanded by the RegCG/GRE/CMV promoter, and the endogenous *ACTB* gene. The dotted lines indicate the region of the corresponding β -actin gene with the RegCG portion of the recombinant promoter. The lower arrows indicate the position and direction of the primers, where F and R indicate the forward and reverse primers, respectively. The upper arrows indicate the position of the theoretical TSS. **b** and **c** RT-PCR analysis of the recombinant promoter RegCG/GRE/CMV. At the bottom of the figure, RNA (total RNA), vector (plasmid DNA of pRegCG/GRE/CMV- α TNF-L vector), and primers are indicated. The primers used are indicated with numbers corresponding with numbering in A. This assay is representative of two experiments. **d** RT-PCR analysis of the β -actin gene

The average production of RegCG/CMV and RegCG/GRE/CMV clones was 4-fold higher than the production of clones bearing-the CMV promoter (Fig. 4b). The same difference was also observed when analyzing the top 5 clones of each construct (data not shown). No statistical differences were found in the average production of antibodies from RegCG/CMV and RegCG/GRE/CMV clones, which indicates that the decrease in the activity of the promoters caused by the insertion of GRE does not drastically affect promoter activity in stable cell lines. Therefore, these results confirm that addition of RegCG to the CMV promoter significantly increases the production of recombinant proteins after a period of stabilization of the recombinant clones.

Expression of a recombinant antibody under the control of RegCG/GRE/CMV promoter in suspension cultures

To test the ability of the RegCG/GRE/CMV promoter to generate a clone for industrial production, CHO DG44 cells, deficient in the *dhfr* gene, were co-transfected by lipofection with vectors that express the light and heavy chains of an anti-TNF recombinant antibody, both of them controlled by the RegCG/GRE/CMV promoter (Fig. 5a). The vectors containing the heavy and light chains contained the *dhfr* gene and the neomycin resistance gene (*neo*^r) as the selection systems, and clones were treated with methotrexate. At the end of the selection process, 6 clones were obtained that showed a productivity equal to or greater than 2 pg/cell/day (Fig. 5b). Among these clones, clone 6 was selected and



cultured in a Spinner bottle. The maximum antibody production of this clone was 132 mg/L, which was reached at 13 days of culture, when the cells had a viability above 60% (Fig. 5c). Therefore, we were able to select clones with productivity over $2 \text{ pg cell}^{-1} \text{ days}^{-1}$ at a ratio of 1 in 100 clones selected.

Discussion

The use of CHO cells for therapeutic proteins production has revolutionized the medical research and protein manufacturing fields, since they generate large-scale recombinant proteins with correct assembly and glycosylation patterns compatible with their clinical use. Gene silencing due to transcriptional inactivation by methylation often prevents long-term stability of protein production, which is an inherent drawback for an efficient establishment of stable cell lines with high levels of gene

expression [8]. Although the CMV promoter provides high levels of gene expression, several authors have demonstrated the susceptibility of this promoter to gene silencing [6]. Promoters containing CpG islands, which are regions practically devoid of methylation, have been associated with transcription initiation [25]. In the present study, we evaluated the capacity of a predicted CpG island in the promoter of the *ACTB* gene of *Cricetulus griseus* to improve the production of recombinant proteins in CHO cells. This region, which we called RegCG, includes the proximal promoter, the exon I, and the intron I of the *ACTB* gene. We demonstrate that RegCG behaves as a promoter and that it is more resistant to silencing than the CMV promoter.

Several tools have been described to target the human *ACTB* gene promoter; however, the promoter regions analyzed in these studies were different from the one characterized here. For example, Damdindorj et al. described a minimal portion of the human *ACTB* gene promoter that is able to sustain gene expression in stable cell lines. This portion of the promoter includes the 5' region of the promoter and the proximal promoter, where the CAAT, CARG, and TATA boxes are found 30 bp upstream of the exon I. Nevertheless, this sequence does not include the intron I of the gene [16], which has been shown to correlate positively with gene expression levels [26]. Another example is the cytomegalovirus early enhancer chicken/ β -actin (CAG) promoter, a well-known synthetic promoter that provides efficient and stable gene expression in different cell lines. This includes the proximal promoter, the exon I, and a large sequence of the intron I of the chicken *ACTB* gene, followed by the splicing acceptor of the rabbit β -globin gene [27, 28]. In this promoter, the 5' end of the *ACTB* gene promoter was replaced by the enhancer of the CMV promoter, resulting in prolonged transcriptional activity, which was more stable than the CMV promoter [16]. Here, we have generated the RegCG promoter that is more resistant to silencing than the CMV promoter, which included a fragment of the *Cricetulus griseus* *ACTB* gene promoter, although our promoter did not include a 5' end enhancer. Therefore, it is possible that inclusion of a 5' end enhancer sequence into the RegCG promoter may potentiate gene transcription.

Here we also generated a synthetic chimeric promoter containing RecCG and CMV promoters and provide evidence that this chimeric promoter presents higher activity than the CMV and RegCG promoters alone in stables clones. Our finding is in accordance with the results obtained by William et al., who have previously shown that the incorporation of Ubiquitous Chromatin Opening Elements (UCOE) la methylation free CgG island upstream the CMV promoter decreased silencing of the recombinant gene with the consequent increase

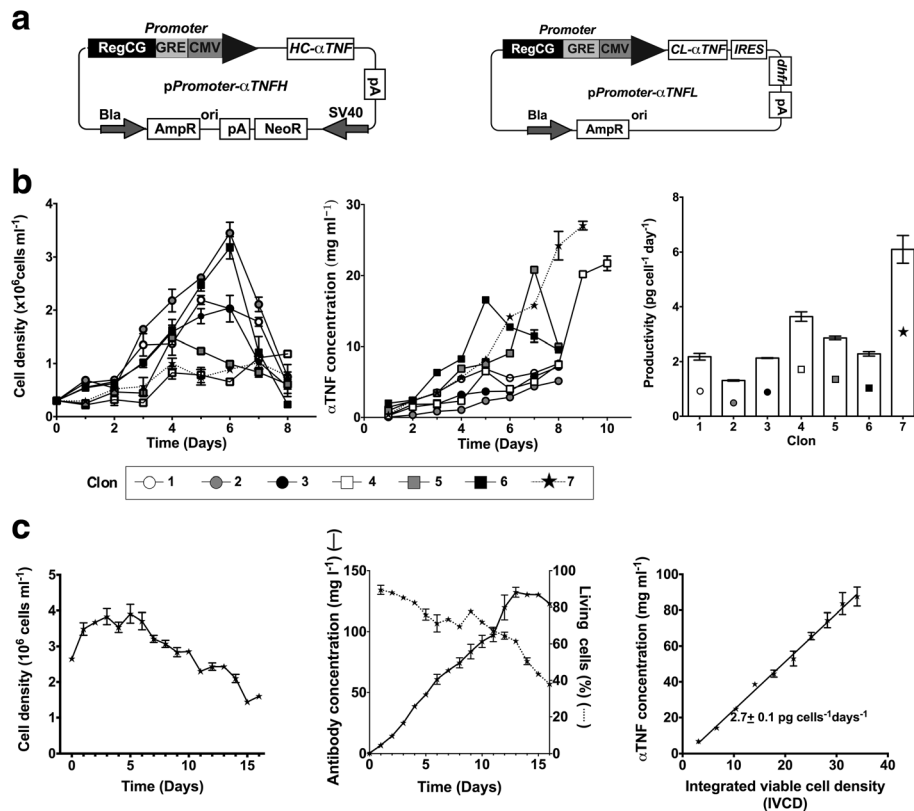


Fig. 5 Production of a recombinant antibody in CHO DG44 cells with a promoter containing RegCG. CHO DG44 cells were co-transfected with vectors expressing an anti-human tumor necrosis factor (TNF) antibody under the control of the chimeric promoter RegCG/GRE/CMV, subjected to genetic amplification by methotrexate; cell populations with higher production of antibodies were isolated by FACS. Clones were seeded in semi-solid medium, cultured in 96-well plates and their volumetric antibody production was analyzed by ELISA. **a** Schematic representation of pRegCG/GRE/CMV- α TNF-L and pRegCG/GRE/CMV- α TNF-H vectors to express the light and high chains of a human anti-TNF-L antibody. **b** The volumetric antibody production, viability, and specific productivity of the 7 highest production clones cultured in 125 mL flasks are shown. **c** The clone with the highest production level (clone number 7) was grown in a Spinner bottle. Cell density, viability, volumetric production, and specific productivity is shown. Representative result of three independent experiments

in the production of recombinant proteins [29]. This effect is caused by inhibiting the promoter gene silencing, a mechanism well described for the CMV promoter [6]. However, Brendel et al. demonstrated that, although providing protection to the silencing of genes, UCOE does not protect a viral promoter located downstream from it from methylation [30]. While it is possible that RegCG does not protect the CMV promoter from silencing in chimeric promoters, we observed that RegCG/CMV promoter reached is more activity than the CMV promoter alone (Fig. 2b), indicating that this chimeric promoter shows greater activity than the sum of the activities of RegCG and CMV promoters individually. Thus, the contribution of CMV to the activity of the chimeric promoter appears to be greater than that observed for clones that contain the CMV promoter alone after the stabilization period. Whether the silencing mechanisms of CMV in chimeric promoters is dependent on RegCG is an aspect that should be

clarified in order to understand the exact mechanism of these promoters.

Feng et al. reported an alternative isoform of an amphioxus *ACTB* gene of embryonic expression, whose transcription begins in the intron I, which is commanded by its own CAAT, CArG and TATA elements that are present inside the intron I [21]. In mammals, the intron I of the *ACTB* gene also contains a CArG box [23], which may present some regulatory function in the intronic TSS. In contrast, intronic CArG box of the RegCG promoter probably is not regulating the intronic TSS, since this is located downstream the intronic TSS, and contains a T for a C mutation, which affects the consensus sequence (Additional file 3: Figure S2). In addition, we observed a decreased reporter activity in the RegCG mutant (RegCGdel), which lacks the CAAT and CArG boxes of the proximal promoter, indicating that these elements command the activity of RegCG. These results suggest that the intronic TSS is

commanded by the CAAT and/or CArG boxes of the proximal promoter and not by intronic regulatory elements.

Recent evidence shows that there is coordination between the transcription machinery, the splicing machinery and the state of chromatin [31, 32]. It has been proposed that the splicing process of some genes increases the transcriptional activity of the promoter [31, 32]. However, the intronic TSS of some genes are activated independently of the splicing process, while it depends on the DNA sequence [33, 34]. Here, the characteristics of the intron sequence of the *ACTB* gene may facilitate a nucleosomal conformation that makes it more accessible to the transcription machinery [33]. Interestingly, these characteristics have also been attributed to the CpG island, where the demethylated promoters have a nucleosome-free region surrounding the TSS. For that reason, chromatin in this area would be intrinsically accessible without the need for a nucleosome shift [33]. Therefore, the initiation of transcription within the RegCG intron supports the idea that its transcriptional activity is due to its CpG island features, independent of the splicing process.

The UCOE has been widely studied for their capacity to improve CMV promoter activity in stably transfected CHO cells [29, 35]. The increased antibody production yield obtained with our chimeric promoters (RegCG/CMV and RegCG/GRE/CMV) compared with CMV promoter was similar to that previously reported by Betts et al, who used a UCOE incorporated upstream the CMV promoter [35]. On the other hand, we incorporated a tandem of 5 GRE between RegCG and CMV (RegCG/GRE/CMV) and tested the induction capacity of this promoter with dexamethasone, although no significant increase in gene expression was observed (data not shown). Nevertheless, the presence of the GRE insert did not affect the antibody production in stable cell lines with the RegCG/GRE/CMV chimeric promoter with respect to RegCG/CMV. Therefore, another change in the chimeric promoter could be used to re-establish the splicing capacity of the intron I present in RegCG to evaluate whether it can improve the activity of the promoter, making it more similar to the CAG promoter [27]. Alternatively, RegCG can be tested alone, or in combination with other promoters (such as SV40 promoter) to improve the production of antibodies.

Conclusions

We have generated an efficient transcription promoter by combining a CpG island fragment of the *ACTB* gene from *Cricetulus griseus* (RegCG) with the CMV promoter. RegCG behaves as a promoter that sustains the expression of recombinant proteins in stable cell lines, which is more resistant to gene silencing than the CMV

promoter. The generation of promoters by the combination of RegCG with CMV results in promoters with greater activity in stable cell lines as compared to both promoters separately. We showed that these chimeric promoters are compatible with the genetic amplification system in CHO DG44 cells and allow the generation of stable cell lines with high production of recombinant antibodies. We propose that this promoter can be used for the generation of industrial cell lines for the production of recombinant antibodies.

Additional files

Additional file 1: Table S1. List of primers. (DOCX 18 kb)

Additional file 2: Figure S1. Pairing of the primers for the synthesis of a glucocorticoid response element (GRE) tandem. The alignment of the hybridized primers is shown, prior to their ligation with T4 Ligase through the cohesive ends generated. a) Synthesis of short portion of CMV promoter (Core). b) Synthesis of a tandem of five Glucocorticoid Response Element (GRE). In celestial the palindromic elements of the GRE site are shown, and in yellow the cohesive ends compatible with restriction enzymes are shown. (DOCX 13 kb)

Additional file 3: Figure S2. Alignment of promoter sequences of the gene for the beta actin of Gallus (Gall), Human (Hum), Chinese Hamster (CHO), mouse (Mus) and rat (Rat). In Amarillo, the CAAT, TATA and CArG boxes stand out. In green, the *XhoI* restriction site and the start codon of beta-actin are highlighted. The arrows > and < indicate the start and end, respectively of the CpG Island, the start of transcription and the intron I for the sequence of the CHO cell genome. (DOCX 16 kb)

Acknowledgements

We much appreciate the valuable comments that we received from other members of our laboratories. We thank Mr. Luis Valenzuela for the technical support during the construction of chimeric vectors. We also would like to thank Ms. Nancy Fabres and Juana Orellana for their invaluable expert technical assistance.

Authors' contributions

RZ, PHS, JCA and MCM conceived and designed the study. RZ, MGG, CA and NC performed the laboratory experiments. MGG participated in the cloning of anti-TNF antibodies expression vectors. NC participated in cloning of expression vectors and in the generation of anti-CD20 production lines. RZ, MGG and MCM analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript. PHS, CL, CHR and CA analyzed and interpreted the data. MCM and JCA supervised the work. All authors contributed to manuscript revision and approved the submitted version.

Funding

This project was financially supported by grants from the following Chilean Research Foundations: FONDEF/CONICYT (D0911190 TO JCA AND ID16110027 to MCM), and ENLACE con Concurso FONDECYT Regular /VID University of Chile (ENL013/17 to MCM).

Availability of data and materials

The data and materials used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Centro de InmunoBiotecnología, Programa de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ²Doctorado en Química, Universidad República Oriental del Uruguay, Montevideo, Uruguay. ³Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay. ⁴Facultad de Química, Universidad República Oriental del Uruguay, Montevideo, Uruguay. ⁵Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile. ⁶Business Development Department, Fundación Fraunhofer Chile Research, Santiago, Chile. ⁷Programa de Doctorado en Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Received: 14 March 2019 Accepted: 11 June 2019

Published online: 28 June 2019

References

1. Tiller KE, Tessier PM. Advances in antibody design. *Annu Rev Biomed Eng.* 2015;17:191–216. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040733>.
2. Aravena O, Pesce B, Soto L, Orrego N, Sabugo F, Wurmman P, Molina MC, Alfaro J, Cuchacovich M, Aguillon JC, Catalan D. Anti-TNF therapy in patients with rheumatoid arthritis decreases Th1 and Th17 cell populations and expands IFN- γ -producing NK cell and regulatory T cell subsets. *Immunobiology.* 2011;216(12):1256–63. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.006>.
3. Nakajima T, Okayama H, Ashizawa M, Noda M, Aoto K, Saito M, Monma T, Ohki S, Shibata M, Takenoshita S, Kono K. Augmentation of antibody-dependent cellular cytotoxicity with defucosylated monoclonal antibodies in patients with GI-tract cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(2):2604–10. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7556>.
4. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2004;22(11):1393–8. <https://doi.org/10.1038/nbt1026>.
5. Radhakrishnan P, Basma H, Klinkebiel D, Christman J, Cheng PW. Cell type-specific activation of the cytomegalovirus promoter by dimethylsulfoxide and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(9):1944–55. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.02.014>.
6. Brooks AR, Harkins RN, Wang P, Qian HS, Liu P, Rubanyi GM. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med.* 2004;6(4):395–404. <https://doi.org/10.1002/jgm.516>.
7. Osterlehner A, Simmeth S, Gopfert U. Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(11):2670–81. <https://doi.org/10.1002/bit.23216>.
8. Yang Y, Mariati, Chusainow J, Yap MG. DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines. *J Biotechnol.* 2010;147(3–4):180–5. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.04.004>.
9. Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem.* 2003;278(6):4035–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210256200>.
10. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998;19(2):187–91. <https://doi.org/10.1038/561>.
11. Mahe EA, Madigou T, Salbert G. Reading cytosine modifications within chromatin. *Transcription.* 2018;9(4):240–7. <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1406435>.
12. Han H, Cortez CC, Yang X, Nichols PW, Jones PA, Liang G. DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum Mol Genet.* 2011;20(22):4299–310. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr356>.
13. Farre D, Bellora N, Mularoni L, Messeguer X, Alba MM. Housekeeping genes tend to show reduced upstream sequence conservation. *Genome Biol.* 2007;8(7):R140. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r140>.
14. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.* 2013;29(10):569–74. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>.
15. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987;196(2):261–82.
16. Damdindorj L, Karnan S, Ota A, Takahashi M, Konishi Y, Hossain E, Hosokawa Y, Konishi H. Assessment of the long-term transcriptional activity of a 550-bp-long human beta-actin promoter region. *Plasmid.* 2012;68(3):195–200. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.07.003>.
17. Kosuga M, Enosawa S, Li XK, Suzuki S, Matsuo N, Yamada M, Roy-Chowdhury J, Koiwai O, Okuyama T. Strong, long-term transgene expression in rat liver using chicken beta-actin promoter associated with cytomegalovirus immediate-early enhancer (CAG promoter). *Cell Transplant.* 2000;9(5):675–80.
18. Shi Y, Xiang J, Zhou G, Ron TB, Tong HI, Kang W, Sun S, Lu Y. The Pacific white shrimp beta-actin promoter: functional properties and the potential application for transduction system using recombinant Baculovirus. *Mar Biotechnol (NY).* 2016;18(3):349–58. <https://doi.org/10.1007/s10126-016-9700-1>.
19. Feng H, Cheng J, Luo J, Liu SJ, Liu Y. Cloning of black carp beta-actin gene and primarily detecting the function of its promoter region. *Yi Chuan Xue Bao.* 2006;33(2):133–40. [https://doi.org/10.1016/S0379-4172\(06\)60032-2](https://doi.org/10.1016/S0379-4172(06)60032-2).
20. Xiao X, Li M, Wang K, Qin Q, Chen X. Characterization of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) beta-actin promoter supports beta-actin gene as an internal control for gene expression modulation and its potential application in transgenic studies in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2011;30(4–5):1072–9. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.02.008>.
21. Feng J, Li G, Liu X, Wang J, Wang YQ. Functional analysis of the promoter region of amphioxus beta-actin gene: a useful tool for driving gene expression in vivo. *Mol Biol Rep.* 2014;41(10):6817–26. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3567-x>.
22. Torres M, Zuniga R, Gutierrez M, Vergara M, Collazo N, Reyes J, Berrios J, Aguillon JC, Molina MC, Altamirano C. Mild hypothermia upregulates myc and xbp1s5 expression and improves anti-TNF α production in CHO cells. *PLoS One.* 2018;13(3):e0194510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194510>.
23. Danililition SL, Frederickson RM, Taylor CY, Miyamoto NG. Transcription factor binding and spacing constraints in the human beta-actin proximal promoter. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(24):6913–22.
24. Shen X, Mao H, Miao S. Substitution pattern of the CarG element in human and mouse genomes. *Genome.* 2011;54(2):144–50. <https://doi.org/10.1139/G10-105>.
25. Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(8):1647–58. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3088-6>.
26. Park SG, Hannehalli S, Choi SS. Conservation in first introns is positively associated with the number of exons within genes and the presence of regulatory epigenetic signals. *BMC Genomics* 2014;15:526. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-526>.
27. Miyazaki J, Takaki S, Araki K, Tashiro F, Tominaga A, Takatsu K, Yamamura K. Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene.* 1989;79(2):269–77.
28. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 1991;108(2):193–9.
29. Williams S, Mustoe T, Mulcahy T, Griffiths M, Simpson D, Antoniou M, Irvine A, Mountain A, Crombie R. CpG-island fragments from the HNRPA2B1/CBX3 genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 2005; 5:17. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-17>.
30. Brendel C, Muller-Kuller U, Schultze-Strasser S, Stein S, Chen-Wichmann L, Krattenmacher A, Kunkel H, Dillmann A, Antoniou MN, Grez M. Physiological regulation of transgene expression by a lentiviral vector containing the A2UCOE linked to a myeloid promoter. *Gene Ther.* 2012;19(10):1018–29. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.167>.
31. Shaul O. How introns enhance gene expression. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017;91(Pt B):145–55. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.06.016>.
32. Neves LT, Douglass S, Spreafico R, Venkataramanan S, Kress TL, Johnson TL. The histone variant H2AZ promotes efficient cotranscriptional splicing in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* 2017;31(7):702–17. <https://doi.org/10.1101/gad.295188.116>.
33. Gallegos JE, Rose AB. The enduring mystery of intron-mediated enhancement. *Plant Sci.* 2015;2378–15. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.04.017>.
34. Gallegos JE, Rose AB. Intron DNA sequences can be more important than the proximal promoter in determining the site of transcript initiation. *Plant Cell.* 2017;29(4):843–53. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00020>.
35. Betts Z, Dickson AJ. Assessment of UCOE on recombinant EPO production and expression stability in amplified Chinese hamster ovary cells. *Mol Biotechnol.* 2015;57(9):846–58. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9877-y>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.